

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von PD Dr. Monika Rinder

Aviäre Bornaviren bei Papageien: Untersuchungen zur Antigen-Verteilung im Gewebe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Barbara Alexandra Löffler
aus Weißenburg

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Rinder
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. El-Matbouli

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

SEHT DEN VOGEL...

Seht den Vogel! er fliegt von einem Baume zum andern,
Nascht mit geschäftigem Pick unter den Früchten umher.
Frag' ihn, er plappert auch wohl und wird dir offen versichern,
Daß er der hehren Natur herrliche Tiefen erpickt.

Johann Wolfgang von Goethe

(1749-1832)

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1.	Neuropathische Drüsenmagendilatation (Proventricular	
	dilatation disease)	3
2.1.1.	Klinik und Symptomatik	3
2.1.2.	Differentialdiagnosen	4
2.1.2.1	Gastrointestinale Störungen.....	4
2.1.2.2.	Neuronale Störungen.....	5
2.1.3.	Diagnostik.....	6
2.1.4.	Verlauf und Therapie	9
2.1.5.	Pathologische und histopathologische Veränderungen.....	10
2.1.6.	Mögliche Ätiologien: Historie und aktueller Stand	12
2.2	Bornaviridae.....	16
2.2.1.	Bornasche Krankheit	16
2.2.1.1	Historie, Klinik und Epidemiologie	16
2.2.1.2	Histopathologie und Immunpathogenese	19
2.2.2.	Borna disease virus (BDV).....	22
2.2.2.1	Genomaufbau und Virusproteine	23
2.2.2.2	Besonderheiten: Transkription und Persistenz	25
2.2.3.	Aviäres Bornavirus (ABV).....	27
2.2.3.1	Entdeckung und Charakteristika	27
2.2.3.2	Nachweismöglichkeiten	29
III.	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1.	Tierauswahl und Probengewinnung.....	33
3.2.	Herstellung histologischer Schritte.....	33
3.3.	Hämatoxylin-Eosin Färbung	34
3.4.	Immunhistochemische Färbung	34
3.4.1.	Optimierung der Erstantikörperkonzentration	34

3.4.2.	Durchführung und Negativkontrollen	35
3.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.5.1.	RNA-Extraktion und Reverse Transkription	36
3.5.2.	Realtime PCR	37
3.5.3.	konventionelle PCR	38
IV.	ERGEBNISSE	40
4.1.	Histopathologische Untersuchungen hinsichtlich PDD	40
4.1.1.	Zentrales Nervensystem (ZNS)	40
4.1.2.	Magen-Darm-Trakt	40
4.2.	Immunhistochemische Färbung der Gewebe- und Organproben.....	41
4.2.1.	Zentrales Nervensystem und Auge	42
4.2.2.	Verdauungstrakt mit Anhangsdrüsen	43
4.2.3.	Endokrine Organe und Gonaden.....	46
4.2.4.	Andere Gewebe und Organe.....	48
4.3.	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Genotypisierung	54
V.	DISKUSSION.....	59
5.1.	Interpretation von Histologie, PCR und Immunhistochemie	59
5.2.	Vergleich von ABV und BDV hinsichtlich ihrer Organverteilung.....	62
5.3.	Ausscheidung und Übertragung von ABV und BDV	66
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	71
VII.	SUMMARY	73
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	75
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	96
X.	DANKSAGUNG.....	97

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABV	Aviäres Bornavirus
Ak	Antikörper
aPMV	Aviäres Paramyxovirus
BaSO ₄	Bariumsulfat
BD	Borna disease
BDV	Borna disease virus
bp	Basenpaare
CA	Cornu Ammonis
CD	Cluster of differentiation
Cdc2	Cell division control kinase 2
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
Ct	Threshold cycle
COX	Cyclooxygenase
DEF	Duck embryo fibroblasts
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
gp	glycoprotein
HE	Hämatoxylin- Eosin
HMGB1	High-mobility group box 1
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
IFN γ	Interferon γ

IFT	Immunfluoreszenztest
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton
MAP	Mitogen-activated Protein
MEK	Mitogen-activated protein kinase/ extracellular-signal-regulated kinase
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Nr	Nummer
ORF	offener Leserahmen (Open reading frame)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PDD	Neuropathische Drüsenmagendilatation (Proventricular dilatation disease)
pH	potentia Hydrogenii
Raf Kinase	Rapidly accelerated fibrosarcoma kinase
RIG-1	retinoic acid inducible gene protein 1
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkriptase
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
TGFβ	Transforming growth factor β
TLR	Toll-like receptor
TH	T-Helfer

TNF α	Tumornekrosefaktor α
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America)
UV Licht	Ultraviolettes Licht
ZNS	Zentrales Nervensystem
μm	Mikrometer

I. EINLEITUNG

Die neuropathische Drüsenmagendilatation oder auch Proventricular dilatation disease (PDD) wurde Ende der 70er Jahre als „macaw wasting syndrome“ bekannt, da sie zunächst fast ausschließlich bei Aras festgestellt wurde. Mittlerweile wurde diese Erkrankung aber bei über 50 verschiedenen Papageienarten beschrieben, tritt aber überwiegend bei Großpapageien wie Aras, Amazonen oder Graupapageien auf, bei denen PDD mit 60-70% die häufigste Magen-/Darmerkrankung darstellt. Aber auch bei Kakadus und Konuren macht diese Krankheit noch über 50% der Magen-/Darmerkrankungen aus (Reavill und Schmidt, 2007). Bei der PDD handelt es sich um eine chronisch auszehrende und stets tödlich endende Erkrankung der Psittaziden. Klinisch ist sie durch Verdauungsstörungen wie Durchfall, Anorexie und das Ausscheiden unverdauter Körner im Kot und neurologische Symptome, die sich durch Koordinationsstörungen, Tremor oder Paresen äußern, gekennzeichnet. Bislang wurden sehr unterschiedliche Verläufe der Erkrankung beschrieben, die von perakuten oder akuten Todesfällen nach wenigen Tagen bis hin zu wochen- und monatelangen Krankheitsgeschehen reichen (Phalen, 1986, Gregory et al., 1994). PDD ist bisher in USA, Kanada, Südamerika, Europa, Australien, Südafrika und im Nahen Osten aufgetreten. (Doneley et al., 2007, Gancz et al., 2010); eine weltweite Verbreitung ist anzunehmen.

Kürzlich wurde bei an PDD erkrankten Papageien eine neue Gruppe von Erregern nachgewiesen, die den Erregern der Bornaschen Krankheit der Säugetiere, die den Mononegavirales zugeordnet werden, sehr ähnlich sind und daher als aviäre Bornaviren bezeichnet wurden (Honkavuori et al., 2008, Kistler et al., 2008). Weitere Untersuchungen bestätigten eine Assoziation der aviären Bornaviren mit PDD (De Kloet und Dorrestein, 2009, Lierz et al., 2009, Rinder et al., 2009, Villanueva et al., 2009, Kistler et al., 2010, Raghav et al., 2010). In ersten Infektionsversuchen wurde inzwischen auch ein ätiologischer Zusammenhang zwischen aviären Bornaviren und PDD bestätigt (Gancz et al., 2009a, Gray et al., 2010). Studien zur Verteilung der Viren im Organismus, die sich im wesentlichen auf Organe des Verdauungstraktes und das Nervensystem fokussierten, zeigten einen breiten Gewebetropismus, der in deutlichem Unterschied zum Neurotropismus der Borna Disease Viren bei Pferd und Schaf steht (Ouyang et al.,

2009, Rinder et al., 2009, Weissenböck et al., 2009b).

Unklar ist derzeit, wie die Erreger von einem Vogel auf den anderen übertragen werden, auch wenn ABV-Nachweise im Kot eine fäkal-orale Transmission vermuten lassen (Rinder et al., 2009, Hoppes et al., 2010). Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mittels immunhistologischer und molekularbiologischer Methoden die Gewebeverteilung aviärer Bornaviren in an PDD erkrankten Papageien zu erfassen und insbesondere hinsichtlich einer möglichen Virusausscheidung auszuwerten.

II. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Neuropathische Drüsenmagendilatation (Proventricular dilatation disease, PDD)

Bei der Neuropathischen Drüsenmagendilatation handelt es sich um eine Erkrankung des Magendarmtraktes und des Nervensystems bei Psittaziden, die bereits Ende der 1970er Jahre beschrieben wurde (Graham, 1984, Hughes, 1984, Clark, 1984). Obwohl eine infektiöse Ursache schon lange vermutet wurde (Gregory et al., 1997), wurden erst im August 2008 aväre Bornaviren erstmals mit dieser Erkrankung in Verbindung gebracht (Honkavuori et al., 2008, Kistler et al., 2008). Wie im Folgenden dargestellt, werden diese Erreger mittlerweile allgemein als Erreger dieser Erkrankung angesehen (Gancz et al., 2010, Hoppes et al., 2010, Payne et al., 2011).

2.1.1 Klinik und Symptomatik

Die neuropathische Drüsenmagendilatation der Psittaziden, im Englischen auch proventricular dilatation disease (PDD) genannt, stellt eine komplexe Erkrankung dar. Neben akuten Krankheitsgeschehen beobachtet man gerade bei älteren Vögeln chronische Verläufe. Die Tierhalter bemerken in der Regel erst bei fortgeschrittenen Symptomen die Krankheit, da die Vögel zunächst bei erhaltenem Appetit im Körpergewicht abnehmen und das Allgemeinbefinden zum Teil nur phasenweise beeinträchtigt ist. Zudem kommt das Problem der allgemeinen Symptomarmut bei Vögeln. Als Flucht- und Beutetier zeigt ein Vogel Krankheitsanzeichen erst sehr spät, wenn es ihm nicht mehr gelingt diese zu verbergen.

PDD betrifft entweder den Gastrointestinaltrakt oder das zentrale Nervensystem oder beide Bereiche. Dementsprechend variabel sind die Symptome. Einerseits treten häufig Durchfall, Erbrechen und Regurgitation, sowie Anorexie und Ausscheidung unverdauter Körner im Kot auf. Andererseits kann sich PDD aber auch durch neuronale Ausfälle wie Ataxien und Koordinationsstörungen, Tremor oder Paresen äußern. Beide Symptomenkomplexe gehen mit Depression, allgemeiner Schwäche und Abmagerung bis hin zur Kachexie einher (Ridgway

und Gallerstein, 1983, Clark, 1984, Gerlach, 1984, Hughes, 1984, Woerpel und Roskopf, 1984a). Außerdem wird seit kurzem auch Blindheit als Symptom der PDD diskutiert. Histologisch und elektroretinographisch bestätigte retinale Degeneration bei einem PDD-kranken Graupapagei nach Ausschluss anderer Ursachen wie traumatisch bedingten Veränderungen und Toxoplasmose führten zu dieser Annahme (Steinmetz et al., 2008).

PDD wurde bisher bei mehr als 50 Psittaziden-Spezies beschrieben. Zusätzlich wurden PDD-ähnliche Veränderungen auch bei Tukanen, Ammernvögeln, Kanarien, Prachtfinken, Ibisvögeln (Gregory et al., 2000), wildlebenden Kanadagänsen (Daoust et al., 1991) und einem Wanderfalke (Shivaprasad, 2005) dokumentiert. Erstaunlicherweise wurde diese Erkrankung noch nicht bei Wellensittichen diagnostiziert. Auch wenn diese oft PDD- verdächtige Symptome zeigen, so handelt es sich doch meistens um eine Megabakteriose (Erkrankung durch *Macrorhabdus ornithogaster*) (Reavill und Schmidt, 2007). Weiterhin sind keine Geschlechts- oder Altersdispositionen bei PDD bekannt (Doolen, 1994).

2.1.2 Differentialdiagnosen

2.1.2.1 Gastrointestinale Störungen

Im Magendarmtrakt zeichnet sich PDD durch eine verlängerte Passagezeit der Ingesta aus, was zu Stasen und Anschoppungen unter anderem im Drüsenmagen mit der Folge einer Dilatation führen kann. Infolge dessen kommt es zu Anorexie, Regurgitieren oder Erbrechen. Dieses klinische Bild kann auch durch Passagehindernisse wie verschluckte Fremdkörper, Bezoare, und Tumore des Verdauungstraktes oder der Leibeshöhle hervorgerufen werden. Für die bei PDD beobachteten Verdauungsstörungen können auch eine nicht-tierartspezifische Fütterung, die besonders faserarm oder fettreich ist (Ei, Kuchen, Cremedesserts) und fehlendes Gritangebot in Kombination mit Mangelerscheinungen als nicht-infektiöse Ursachen in Betracht gezogen werden (Krautwald-Junghanns und Frese, 1987, Ritchie et al., 1994). Intoxikationen durch die Aufnahme von Blei oder Zink können sich ebenfalls in Durchfall und Polyurie äußern. Zusätzlich kann eine Bleiintoxikation auch eine Drüsenmagendilatation auslösen. Die Schwermetalle werden durch Beknabbern von Haushalts- oder Einrichtungsgegenständen aufgenommen. Mit Hilfe der Magensäure werden die

Schwermetalle als Salze gelöst und gelangen über das Blut in sämtliche Organe und Gewebe (De Francisco et al., 2003), wo sie sowohl das zentrale als auch das periphere Nervensystem schädigen. Dadurch entstehen Darmkoliken, welche sich in Form von Durchfall äußern. Zu beachten gilt weiterhin, dass bei jungen Papageien, insbesondere bei Handaufzucht, bis zum Umstellen auf Körnernahrung der Drüsenmagen physiologischerweise dilatiert ist, was nicht mit einer PDD verwechselt werden darf (Bond et al., 1993).

Bei den infektiösen Ursachen stehen chronische Enteritiden im Vordergrund, die genauso wie PDD mit Durchfall und Abmagerung bei erhaltener Futteraufnahme einhergehen. Dazu gehört in erster Linie eine Infektion mit Mykobakterien und Salmonellen sowie mit Megabakterien (*Macrorhabdus ornithogaster*), die insbesondere bei Sittichen und Agaporniden häufig festgestellt werden. Weiterhin kann ein hochgradiger Parasitenbefall durch Würmer (Askariden) oder Einzeller (Flagellaten, Giardien, Kokzidien) zu schweren Durchfällen führen (Antinoff, 2001). Außerdem müssen Pilzinfektionen nicht nur im Verdauungstrakt (Candidiasis), sondern im gesamten Organismus berücksichtigt werden. Eine Aspergillose beispielsweise kann durch die dabei gebildeten Mykotoxine ebenfalls zu Durchfällen in Kombination mit Erbrechen führen. Neben Mykotoxikosen können auch Intoxikationen durch Zimmerpflanzen oder Chemikalien zu dieser Symptomatik führen (Clark, 1984, Woerpel und Roskopf, 1984b, Krautwald-Junghanns und Frese, 1987).

2.1.2.2 Neurologische Störungen

Die in der Praxis am häufigsten vorgestellten neurologischen Symptome umfassen Anfälle, Ataxien, Paresen, Paralysen, Tremor und Kopfschiefhaltung und können auch bei PDD auftreten. Differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden müssen nicht-infektiöse ernährungsbedingte Ursachen wie Vitamin E/Selenmangel oder, insbesondere bei Graupapageien, Hypocalzämie. Aber auch alle Gegebenheiten, die zu einer intrakraniellen Druckerhöhung führen, lösen neurologische Störungen aus. Dazu gehören Tumore, Hydrozephalus, meningeale Blutungen, Stauung der Vena jugularis oder Arteriosklerose. Weiterhin sollte an traumatisch bedingte Gehirnerschütterungen oder Epilepsie gedacht werden (Shivaprasad, 1993). Auch Intoxikationen können neurologische Ausfälle zur Folge haben; allen voran stehen die Blei- und Zinkintoxikation. Sie können, wie bereits erwähnt, auch gastrointestinale Störungen hervorrufen und somit mit exakt

gleicher Symptomatik wie die PDD einhergehen. Sie stellen daher eine der wichtigsten Differentialdiagnosen dar. Desweiteren können Intoxikationen durch Inhaltstoffe von Pflanzen oder Organophosphate ZNS-Störungen zur Folge haben. Bei den Pflanzen seien als Beispiele Aronstab, Azalee, Eibe oder Narzissen genannt; giftige Chemikalien sind vor allem Lösungsmittel (Nitrolacke), Pflanzen- oder Holzschutzmittel, Alkohol und Kochsalz (Wedel, 2004).

Als infektiöse Ursachen kommen verschiedene Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten in Frage. Bei den Viruserkrankungen müssen vor allem Paramyxoviren in Betracht gezogen werden, aber auch Herpes- und Adenoviren oder das Eastern Equine Encephalomyelitis Virus wurden bei Psittaziden mit neurologischen Störungen diagnostiziert. Als bakterielle Erreger einer Meningitis treten vor allem *Salmonella* sp. und *Chlamydophila psittaci* auf. Seltener führen Pilzinfektionen durch *Aspergillus* sp. oder Cryptokokken im Rahmen einer Erregerstreuung ins Gehirn zu zentralnervösen Störungen. Ebenso selten treten Infektionen mit Toxoplasmen, *Sarcocystis* sp. oder Nematoden im Gehirn auf (Shivaprasad, 1993, Ritchie et al., 1994).

2.1.3. Diagnostik

Aufgrund der Variabilität der Symptome und der Vielzahl der sich daraus ergebenden Differentialdiagnosen, sollte man zur Absicherung der Diagnose einer PDD mit Hilfe gezielter Diagnostik vorgehen (Antinoff, 2001). Anamnestisch ist es besonders wichtig nach Neuzugängen im Bestand zu fragen, auch wenn diese möglicherweise schon einige Jahre zurückliegen. Die Krankheit wird häufig auf diesem Weg in bestehende Gruppen eingetragen.

Nach der klinischen Untersuchung folgt als erster Schritt der weiterführenden Diagnostik eine Röntgenuntersuchung zum Nachweis einer Drüsenmagenerweiterung. Zunächst wird eine Übersichtsaufnahme (Nativaufnahme) in zwei Ebenen (latero-lateral, ventro-dorsal) angefertigt, um die Lage- und Größenverhältnisse der inneren Organe und das Skelettsystem zu beurteilen. Dabei werden wichtige Differentialdiagnosen wie raumfordernde Prozesse im Abdomen dargestellt, welche aber unter Umständen nur schwer von einem dilatierten Drüsenmagen abgegrenzt werden können. Röntgendichte Fremdkörper oder eine schwere Aspergillose können ausgeschlossen werden.

Bereits in dieser Aufnahme können Hinweise auf eine vorhandene Drüsenmagendilatation zu erkennen sein, die oft mit einer Rechtsverlagerung der Leber einhergeht, was sich im Röntgenbild als verbreiteter Leberschatten oder verstrichene sanduhrförmige Einziehung zeigt. Zur Bestätigung eines dilatierten Drüsenmagens sind allerdings Röntgenuntersuchungen mit Kontrastmittel erforderlich. Sofern bei dem Vogel Kotabsatz vorhanden ist und keine Anzeichen einer Perforation des Gastrointestinaltraktes vorliegen, bietet sich die Verwendung von Bariumsulfat (25%iges BaSO₄, 20ml/kg) an. Alternativ kann auch Gastrografin, ein jodhaltiges Kontrastmittel, verwendet werden. Das erste Röntgenbild wird zwei Stunden nach Verabreichen des Kontrastmittels in den Kropf aufgenommen. Bei einer physiologischen Passagerate sollte bei Psittaziden zu diesem Zeitpunkt das Kontrastmittel vom Kropf bis zum Enddarm oder der Kloake vorhanden sein. Passageverzögerungen können durch verminderte Motorik des Gastrointestinaltraktes oder ein Passagehindernis verursacht werden. Sie werden häufig in Zusammenhang mit PDD festgestellt. In der Kontrastmittelaufnahme lässt sich außerdem eine Drüsenmagen- und eventuelle Kropfdilatation deutlich erkennen. Allein diese Tatsache lässt aber noch keine eindeutige Diagnose „PDD“ zu, wie oben bereits erwähnt. Bei der Beurteilung eines vergrößerten Drüsenmagens muss außerdem daran gedacht werden, dass dies bei Jungpapageien vor allem aus Handaufzucht eine physiologische Gegebenheit ist (Bond et al., 1993). Für eine definitive Diagnose einer PDD ist also eine Röntgenuntersuchung keinesfalls ausreichend (Degernes et al., 1996). Wenn die technischen Möglichkeiten gegeben sind, kann anstatt eines Röntgenbildes auch eine Fluoroskopie gemacht werden. Dieses Durchleuchtungsverfahren ermöglicht es, dynamische Prozesse im Körper mittels Röntgenstrahlen darzustellen. Damit können die gleichen Befunde wie im Röntgen erhoben und zusätzlich noch die Darmmotilität in Echtzeit beurteilt werden (Rosenthal, 2008), jedoch ist zu bedenken, dass der Patient bei der Durchleuchtung einer höheren Strahlendosis ausgesetzt ist.

Eine Blutuntersuchung dient in erster Linie dazu, eine Blei- und Zinkintoxikation sowie bakterielle Infektionen auszuschließen. Es gibt bei PDD keine pathognomonischen Veränderungen im Blutbild. Berichtet sind Leukozytosen (Woerpel und Rosskopf, 1984a, Phalen, 1986), Hypoproteinämie und Hypoglykämie (Ridgway und Gallerstein, 1983, Suedmeyer, 1992), sowie ein

Anstieg der Kreatinkinase. Letztere Veränderungen sind allerdings eher sekundärer Natur, da sie auf eine negative Energiebilanz und Schädigung der Muskulatur zurückzuführen sind (Ridgway und Gallerstein, 1983, Phalen, 1986).

Wie in Kapitel 2.2.2.3 näher dargestellt ist, hat momentan die Labordiagnostik im Hinblick auf den Nachweis aviärer Bornaviren stark an Bedeutung gewonnen. Dazu stehen bereits PCRs (Honkavuori et al., 2008, Kistler et al., 2008, Weissenböck et al., 2009b), Western blot (Villanueva et al., 2010), ELISA (De Kloet und Dorrestein, 2009) und Immunfluoreszenztests zur Verfügung (Herzog et al., 2010). Die Ergebnisse der genannten diagnostischen Tests sind aber vermutlich noch nicht verlässlich genug, um eine ABV-Infektion sicher nachzuweisen. Ein negativer RNA- oder Antigennachweis schließt eine ABV-Infektion nicht aus, da möglicherweise nicht alle Stämme erkannt werden. Beim Antikörpernachweis können Kreuzreaktionen derzeit nicht ausgeschlossen werden, was zu falsch positiven Ergebnissen führen würde. Zudem muss grundsätzlich zwischen der Diagnose einer Infektion mit aviären Bornaviren (Nachweis eines Virus) und der Feststellung einer PDD (Nachweis einer Erkrankung) unterschieden werden. Daher sollten hinsichtlich der Diagnose „PDD“ ABV-Labortests nur in Kombination mit klinischen und, wenn möglich, mit histologischen Ergebnissen interpretiert werden.

Als Goldstandard für die Diagnose PDD gilt daher immer noch der Nachweis lymphoplasmazytärer Infiltrate in Ganglien oder Nerven des Gastrointestinaltraktes (Graham, 1991, Gregory et al., 1994, Degernes et al., 1996), in der Regel bei einer Magen- oder Kropfbiopsie. Da diese typischen Läsionen fast genauso häufig im Kropf wie in den Mägen vorkommen, (Gregory et al., 1996) ist die Kropfbiopsie aufgrund der geringeren Invasivität einer Magenbiopsie vorzuziehen. Zu beachten ist, dass die Biopsie alle Wandschichten enthält, in der Nähe eines größeren Blutgefäßes entnommen wird und ausreichend groß (0,5 x 0,5 cm) ist, um die Wahrscheinlichkeit lymphoplasmazytäre Infiltrate zu finden zu maximieren (Gregory et al., 1996) Allerdings liegt die Sensitivität einer Kropfbiopsie dennoch nur bei etwa 76%, damit werden etwa ein Viertel der PDD-Fälle mit dieser Technik fälschlicherweise als negativ beurteilt (Doolen, 1994, Gregory et al., 1996). Als mögliche Ursachen kommen in Frage, dass nicht alle Ganglien des Gastrointestinaltraktes betroffen sind und dass nicht immer Nervengewebe in der Biopsie enthalten ist. Ein negativer Biopsiebefund schließt

PDD also nicht aus. Zukünftig wird aber auch der labordiagnostische ABV-Nachweis an Bedeutung gewinnen.

2.1.4. Verlauf und Therapie

Die Krankheitsverläufe bei PDD sind sehr unterschiedlich. Sie reichen von perakuten Todesfällen bei Jungtieren bis hin zu chronischen Verläufen, bei denen die Vögel unter Umständen noch Jahre überleben können (Phalen, 1986, Rich, 1992). Genauso wie der Krankheitsverlauf kann die Inkubationszeit zwischen wenigen Tagen und mehreren Monaten oder Jahren variieren (Phalen, 1986, Degernes und Flammer, 1991, Suedmeyer, 1992, Doneley et al., 2007). Die durchschnittliche Überlebensdauer der Erkrankung bei tierärztlicher Vorstellung wurde mit 2-15 Tage angegeben. Diese verhältnismäßig kurze Überlebensdauer wurde allerdings lediglich anhand von 40 Vögeln ermittelt (Heldstab et al., 1985, Lublin et al., 2006). Sie ist aber sicherlich auch auf die Tatsache zurückzuführen, dass viele Vögel erst im weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung einem Tierarzt vorgestellt werden. Die erkrankten Vögel sterben an Unterernährung, ZNS-Störungen oder Sekundärinfektionen (Degernes und Flammer, 1991). Die Prognose ist, zumindest zurzeit, stets infaust (Woerpel und Rosskopf, 1984a, Dahlhausen et al., 2002).

Die Therapie beschränkt sich derzeit auf eine symptomatische Behandlung. Besonders wichtig scheint hierbei die Futterumstellung auf Pellets oder Brei zu sein (Grimm et al., 1993). Dieser sollte leichtverdaulich und hochenergetisch sein, um die Energieversorgung des Vogels zu verbessern (Gregory et al., 1997a). Dadurch kann die Überlebenszeit der Vögel unter Umständen einige Jahre verlängert werden (Phalen, 1986, Mannl et al., 1987). Weiterhin wird empfohlen, Vitamine zur Vorbeugung von Mangelerscheinungen und Natriumchlorid- oder Ringerlösung zur allgemeinen Unterstützung zu verabreichen (Ridgway und Gallerstein, 1983, Degernes und Flammer, 1991). Umstritten ist die Gabe von Corticosteroiden, da sie bei Vögeln eine ausgeprägte und im Vergleich zum Säuger langanhaltende Immunsuppression hervorrufen, was den Ausbruch von Sekundärinfektionen begünstigt. Sie scheinen jedoch Nervenschäden durch immunpathologische Reaktionen zu vermindern (Rich, 1992). Bevorzugt wird daher der Einsatz von nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID), die das Enzym

Cyclooxygenase (COX) inhibieren. Dieses Enzym spielt eine tragende Rolle bei der Synthese der Prostaglandine, welche als Vermittler einer Entzündungs- und Schmerzreaktion dienen. Es gibt zwei Isoformen im Körper, die als COX-1 und COX-2 bezeichnet werden. Während COX-1 auch unter Normalbedingungen exprimiert wird und dabei wichtige protektive Wirkungen im Gastrointestinaltrakt hat, ist COX-2 durch verschiedene Stimuli wie proinflammatorische Zytokine im Falle einer Entzündung induzierbar (Gancz et al., 2010). Um die Produktion des magenschützenden Prostaglandin E nicht zu beeinträchtigen, sollten nur selektive COX-2 Hemmer wie Celecoxib (10mg/kg, Celebrex, Pfizer, Groton, Connecticut, USA) eingesetzt werden (Dahlhausen et al., 2002). Eine Studie an drei jungen Graupapageien zeigte eine Verbesserung der Symptome binnen weniger Tage und die Vögel erreichten wieder ein normales Körpergewicht. Ein Monat nach Behandlungsende starb einer der Graupapageien an PDD, die anderen beiden blieben über mindestens drei Monate symptomfrei (Lublin et al., 2006). Da bislang keine kurative Behandlung möglich ist, erscheint der Einsatz von NSAID in jedem Fall sinnvoll. Klinisch-empirische Erfahrungen belegen, dass eine solche Therapie vor allem in frühen Krankheitsstadien die Überlebenszeit verlängert und das Wohlbefinden der Vögel verbessert (Dahlhausen et al., 2002). Um Sekundärinfektionen zurückzudrängen, ist es angeraten, entsprechend der nachgewiesenen Erreger zusätzlich antibiotisch, antimykotisch oder antiparasitär zu behandeln.

2.1.5 Pathologische und histopathologische Veränderungen

Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung fallen ein starker Schwund des Stammfettes und meist eine fortgeschrittene Atrophie der Pectoralismuskulatur auf. Die bis zur Kachexie führende Auszehrung resultiert aus der ungenügenden Futtermittelverwertung im Magen-Darmtrakt. Wahrscheinlich bedingt durch Schädigungen und Zerstörung der die Darmmuskulatur versorgenden Ganglien kommt es infolge von Passagestörungen zu einer bei der pathologischen Untersuchung häufig feststellbaren Anschoppung des Futterbreis, und eine physiologische Verdauung ist nicht mehr möglich. Wie der Name der Erkrankung schon andeutet, ist der dilatierte Drüsenmagen ein typischer Befund. Aber auch der Muskelmagen kann in Zusammenhang mit einer starken Muskelatrophie

vergrößert sein. (Ridgway und Gallerstein, 1983, Hughes, 1984, Busche et al., 1985, Phalen, 1986, Berhane et al., 2001). Die durch die Innervationsstörung bedingte Futteranschoppung weitet durch Druck die Drüsenmagenwand aus, bis sie hauchdünn ist und in manchen Fällen rupturiert (Turner, 1984, Phalen, 1986, Shivaprasad et al., 1995). Die Futteranschoppung kann bis zu Kropf und Ösophagus reichen und auch dort zu einer Ausweitung führen. Auch das Duodenum ist in vielen Fällen dilatiert, was allerdings vermutlich eher durch Gasansammlung bedingt ist (Busche et al., 1985, Heldstab et al., 1985, Joyner et al., 1989, Shivaprasad et al., 1995, Berhane et al., 2001) als durch Futteranschoppung, da durch die Stauung in den Mägen und die in diesen Abschnitten lokalisierten anatomischen Engstellen wahrscheinlich zu wenig Futter ins Duodenum gelangt, um eine Dilatation auszulösen.

Das histologische Bild der PDD ist geprägt von einer nicht-eitrigen Ganglioneuritis vor allem im Gastrointestinaltrakt (Heldstab et al., 1985, Mannl et al., 1987, Joyner et al., 1989, Degernes und Flammer, 1991, Gerlach, 1991, Graham, 1991, Cazayoux Vice, 1992, Shivaprasad et al., 1995, Gregory et al., 1997a, Berhane et al., 2001). Lymphoplasmazytäre Infiltrate finden sich hauptsächlich im Plexus myentericus (Auerbach-Plexus), aber auch im Plexus submucosus (Meißner-Plexus), der allerdings bei Psittaziden weniger stark ausgebildet zu sein scheint (persönliche Mitteilung Prof. H. Gerlach, München). Die mononukleären Infiltrate kommen in über 90% der histologisch untersuchten PDD-verdächtigen Fälle im Drüsen- und Muskelmagen, sowie in den Nebennieren vor (Ritter, 2007). In diesen Organen sind die Infiltrate auch ohne Assoziation mit Nervengewebe zu finden. Aber auch die Ganglien des Kropfes und des Darmes, periphere Nerven, Gehirn und neuronale Anteile des Herzens sind regelmäßig betroffen (Cazayoux Vice, 1992, Shivaprasad et al., 1995, Berhane et al., 2001). Im Gehirn findet man neben einer nicht-eitrigen Enzephalitis häufig degenerative Veränderungen wie eine Vakuolisierung des Neuropils. Zusätzlich werden oftmals aktivierte Mikroglia gefunden. Diese Zellen gehören zu den wichtigsten Immuneffektorzellen des zentralen Nervensystems, da sie sowohl zur Phagozytose als auch zur Antigenpräsentation fähig sind. Aktiviert werden sie durch eine Vielzahl von Stimuli wie Zytokine, Komplementfaktoren, Chemokine oder Bestandteile der extrazellulären Matrix. Aber auch Gliazellproliferationen kommen im zentralen Nervensystem sowie in den

Ganglien des enterischen Nervensystems vor (Berhane et al., 2001, Grund und Ritter, 2004). Weiterhin typisch sind manschettenförmig um die Blutgefäße des Gehirns lokalisierte Infiltrate, auch als „perivascular cuffing“ bezeichnet. Die Dicke der lymphoplasmazytären Manschette und die Anzahl der betroffenen Blutgefäße variiert dabei sehr stark. In Ausnahmefällen wurden auch Pankreatitiden, Uveitiden, Thyreoiditiden und Dermatitis gefunden. Diese Organe zeigten ebenfalls die typischen mononukleären Zellinfiltrate. Bei den Dermatitis waren Hautnerven und die federassoziierte Muskulatur (*M. pennalis*) mitbetroffen (Shivaprasad et al., 1995).

2.1.6 Vermutete Ätiologien: Historie und aktueller Stand

Bereits die ersten ursächlichen Erklärungsversuche der PDD basierten auf einem bis dahin unbekannten Virus. Endemieartiges Auftreten in Beständen vor allem nach Eingliederung von Neuzugängen (Busche et al., 1985, Heldstab et al., 1985) und die nicht-eitrige Entzündungsreaktion begründeten diese Annahme (Hughes, 1984). Aufgrund der histologischen Veränderungen in den Ganglien und des Auffindens von 80- 100nm großen virusartigen Partikeln in Nervengewebe vermutete man ein Virus mit neurotrophen Eigenschaften (Woerpel und Roskopf, 1984b, Busche et al., 1985). Eine experimentelle Übertragung der Erkrankung durch Gewebekomogenate von PDD-kranken Vögeln auf gesunde Psittaziden gelang. In dem verwendeten Gewebekomogenat waren 80nm große Viruspartikel enthalten und Partikel gleichen Aussehens konnten bei den infizierten und erkrankten Papageien im Kot wiedergefunden werden, während die Kontrollgruppe ein Gewebekomogenat ohne Viruspartikel bekam und die Vögel gesund blieben (Gregory et al., 1998).

Bereits bekannte Erkrankungen mit ähnlicher Symptomatik wie die Newcastle Disease oder die aviäre Enzephalitis wurden schnell als Ursache ausgeschlossen (Hughes, 1984). Busche et al. (1985) äußerten den Verdacht, dass Coronaviren beteiligt sein könnten, da sie bei Schweinen eine ähnliche Erkrankung (vomiting and wasting disease) auslösen. Dieser Verdacht wurde Jahre später wieder aufgegriffen, als Coronaviren bei einer PDD-verdächtigen Amazone isoliert wurden (Gough et al., 2006). Als Krankheitsursache waren aber auch Adenoviren (Heldstab et al., 1985), Reoviren (Hughes, 1984) oder das Eastern Equine

Encephalitis Virus (Gregory et al., 1997a) im Gespräch. Für Adenoviren sprach die Morphologie der im Nervengewebe eines an PDD gestorbenen Vogels gefundenen Viruspartikel, dieser Verdacht wurde allerdings durch den Nachweis intranukleärer Einschlüsse widerlegt, die bei Adenoviren nicht vorkommen (Heldstab et al. 1985). Reoviren wurden in den 80er Jahren vermutet, da andere Jungtiererkrankungen wie das Malabsorptionssyndrom der Hühnerküken klinisch Gemeinsamkeiten zeigten (Hughes, 1984). Mit zunehmender Krankheitskenntnis der PDD war dieser Verdacht aber nicht mehr haltbar. Das Eastern Equine Encephalitis Virus ist ausschließlich in Nordamerika verbreitet und eine Infektion bei adulten Vögeln verläuft in der Regel symptomlos. Lediglich Jungvögel zeigen PDD-ähnliche Krankheitszeichen. Dieses Virus wurde als Ursache der Avian Viral Serositis anerkannt und ist als PDD-Ursache nicht mehr verdächtig (Gregory et al., 1997a).

Nicht wirklich geklärt wurde bislang die Rolle von Paramyxoviren (PMV) bei diesem Krankheitsgeschehen. Die Entdeckung von intranukleären und intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen, sowie das Auffinden von behüllten, unterschiedlich großen Viruspartikeln lenkte die Aufmerksamkeit auf die Paramyxoviren (Gerlach, 1984, Mannl et al., 1987). Lentogene aPMV-1 Serotypen wurden schließlich als Ursache der PDD angenommen, da Viruspartikel entsprechend der Morphologie im Kot von erkrankten Tieren nachgewiesen wurden (Grund et al., 2002). Mit einem ELISA, der bei aPMV-1-infizierten Graupapageien bereits 14 Tage post infectionem eine Serokonversion anzeigen konnte, wurden Antikörper gegen PMV-1 bei sehr vielen Psittaziden mit PDD nachgewiesen (Grund et al., 1999). Außerdem konnte PMV-1 aus Nervengewebe von PDD-kranken Vögeln isoliert werden (Grund et al., 2002) und auch im Blut gelang der PMV-1 Nachweis mittels PCR. Dies wurde allerdings nur bei einem histologisch nicht bestätigten Einzelfall einer an PDD-Symptomen erkrankten Amazone dokumentiert (Orosz und Dahlhausen, 2007). Außerdem misslang der Versuch, die Koch'schen Postulate zu erfüllen, also die von Robert Koch formulierten Forderungen zur eindeutigen Identifizierung eines Erregers als Ursache einer Erkrankung. PMV-ähnliche Viruspartikel wurden nämlich nicht nur von erkrankten, sondern auch von klinisch gesunden Vögeln ausgeschieden. Experimentelle Infektionen mit Isolierung des Mikroorganismus aus einem kranken Tier, Überführung in Reinkultur und Erzeugung des gleichen

Krankheitsbildes nach Infektion gesunder Tiere mit dieser Reinkultur waren nicht erfolgreich. Das Auslösen einer PDD nach Infektion mit PMV und die Reisolierung des fraglichen Mikroorganismus, die das letzte Postulat darstellt, gelangen ebenfalls nicht (Grund et al., 2005). Auch neuere Untersuchungsergebnisse aus einem Spixarabestand zweifelten den Zusammenhang zwischen PMV und PDD an. In einem Untersuchungszeitraum von vier Jahren wurde eine sehr niedrige Sensitivität sowohl des PMV-ELISA als auch des Western blots festgestellt. So war aus einer Gruppe von sechs Aras, bei denen PDD mittels Kropfbioptie nachgewiesen war, nach einem Jahr lediglich ein einziger seropositiv für PMV (Deb et al., 2008).

Eine weitere Hypothese zur Entstehung der PDD bestand darin, dass durch eine bakterielle oder virale Infektion, die selbst keine schwerwiegende Erkrankung zur Folge hat, ein autoimmuner Prozess ausgelöst wird. Derartige postinfektiöse Polyneuropathien sind bei Mensch und Tier bekannt und könnten ein Krankheitsbild wie die PDD beim Vogel verursachen. Das würde erklären, warum kein Virus eindeutig als Ursache identifiziert werden konnte, da das Virus selbst bei Ausbruch der Erkrankung vom Immunsystem bereits eliminiert wäre (Graham, 1984, Graham, 1991). Gegen diese Annahme spricht, dass Autoimmunerkrankungen der Nerven in aller Regel mit deren Demyelinisierung einhergehen und das wiederum ein seltener Befund bei PDD ist (Gregory et al., 1997b). Allerdings zeigte ein Screening von Papageienseren nach anti-Gangliosid-Antikörpern bei PDD-kranken Vögeln sehr hohe Titer. Zudem wurde bei einer experimentellen Applikation von aufgereinigten, aber mit Adjuvans versehenen Gangliosiden PDD-Symptomatik ausgelöst (Rossi et al., 2008). Es muss jedoch kritisch bemerkt werden, dass die Aufreinigung aus peripheren Nerven erfolgte und keine Angaben über den Aufreinigungsgrad oder das zugesetzte Adjuvans gegeben wurden. Der Versuch erfolgte an sechs Nymphensittichen ohne Kontrollgruppe, so dass die Ergebnisse dieser Studie kritisch betrachtet werden müssen. Ganglioside sind Membranbestandteile von Neuronen und das Vorkommen von Gangliosid-Autoantikörpern wird in Zusammenhang mit neuropathologischen Syndromen gebracht (Kaida und Kusunoki, 2010). Allerdings werden diese Autoantikörper auch in gesunden Tieren oder Menschen nachgewiesen, so dass sie als alleinige Krankheitsursache in Frage gestellt wurden (Ravindranath et al., 2000). Zudem ist bekannt, dass

manche bakteriellen Polysaccharide mit Gangliosid-Autoantikörpern kreuzreagieren, was die pathogene Bedeutung anzweifeln lässt (Willison und Kennedy, 1993). Bis heute ist aber eine autoimmune Komponente bei PDD nicht völlig ausgeschlossen.

Kürzlich wurden in zwei Fall-Kontroll-Studien zur PDD mittels Microarray-Analyse und anschließender PCR mit Borna Disease Viren verwandte Pathogene nachgewiesen (Kistler et al., 2008). Diese als aviäre Bornaviren (ABV) bezeichneten Erreger wurden in 70% der PDD-Fälle und in keinem der Kontrolltiere festgestellt. Ähnliche Ergebnisse einer weiteren, davon unabhängigen Studie wurden nahezu zeitgleich, ein halbes Jahr später, publiziert. Darin wurden die aviären Bornaviren mittels Pyrosequenzanalyse und anschließender PCR bei an PDD erkrankten Vögeln gefunden (Honkavuori et al., 2008) (Detaillierte Beschreibung siehe Abschnitt 2.2.3.1). Ein ätiologischer Zusammenhang zwischen aviären Bornaviren und PDD ist mittlerweile in zahlreichen Publikationen dargelegt worden (De Kloet und Dorrestein, 2009, Lierz et al., 2009, Ouyang et al., 2009, Rinder et al., 2009, Weissenböck et al., 2009a, Gray et al., 2010, Herzog et al., 2010, Kistler et al., 2010, Reuter et al., 2010, Villanueva et al., 2010, Weissenböck et al., 2010).

2.2 Bornaviridae

2.2.1 Bornasche Krankheit

2.2.1.1 Historie, Klinik und Epidemiologie

Die ersten Beschreibungen der Bornaschen Krankheit gehen auf Authenried, 1813, und Wörz, 1858 zurück. Damals bezeichnet als „hitze Kopfkrankeheit der Pferde“, „Schlafsucht“ oder „Nervenfieber“ wurde sie bald als nicht-eitrige Meningoenzephalitis charakterisiert (Zwick, 1939, Heinig, 1969). Der Name „Bornasche Krankheit“ wurde durch epidemieartige Ausbrüche zwischen 1894 und 1896 bei Kavalleriepferden in der Stadt Borna in Sachsen geprägt. 1924 gelang es erstmalig die Virusätiologie durch Übertragungs- und Reinfektionsversuche zu bestätigen (Zwick und Seifried, 1925). In Deutschland starben zwischen 1896 und 1940 etwa 16.600 Pferde an dieser Krankheit, die periodisch und seuchenhaft auftrat. Nach 1960 sank die Zahl der Ausbrüche

deutlich auf 29-100 Tiere pro Jahr. Ebenfalls zu dieser Zeit nahm aber auch der Pferdebestand erheblich ab. In der Schafpopulation ging die Inzidenz der Bornaschen Krankheit genauso drastisch zurück, während die Schafhaltung zunahm (Dürrwald et al., 2006). Der Rückgang der Zahl der erkrankten Tiere kann also nicht allein auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass sich die Populationszahlen verändert haben; die Ursache ist allerdings bisher ungeklärt. Die Bornasche Krankheit war von Februar 1981 bis Februar 2011 eine meldepflichtige Krankheit nach dem deutschen Tierseuchengesetz. In der ersten Verordnung zur Änderung der Verordnung über meldepflichtige Krankheiten wurden am 11.2.2011 Krankheiten, die selten vorkommen und kaum ökonomische Bedeutung erlangt haben, von der Meldepflicht befreit. Darunter fiel auch die BD.

Ausbrüche der Bornaschen Krankheit beschränkten sich nicht nur auf Deutschland. 1993 wurde der erste Fall in Österreich im Voralberg nachgewiesen, später gab es weitere Fälle auch in der Schweiz und Liechtenstein (Dürrwald et al., 2006). Heute ist Borna disease (BD) in den endemischen Gebieten Deutschlands, Österreichs, der Schweiz und Liechtenstein eine seltene Krankheit, wobei aber eine höhere Infektionsrate nicht ausgeschlossen werden kann, da es symptomlose Infektionen beim Pferd gibt (Herzog et al., 2010). Serologische Untersuchungen in Regionen außerhalb Europas widersprechen allerdings dem unterstellten endemischen Charakter. So zeigen Antikörpernachweise aus Iran, China, Japan oder den USA, dass von einer Ausbreitung über die klassischen Endemiegebiete hinaus auszugehen ist (Reichelt, 2009).

Bei der Bornaschen Krankheit (BD) handelt es sich um eine Enzephalomyelitis, die in der frühen Phase von Verhaltensänderungen geprägt ist und damit eine Erkrankung des limbischen Systems widerspiegelt. Später treten schwere neurologische Störungen auf, die eine ausgeprägte Dysfunktion von motorischen und autonomen Zentren reflektieren. Typische Symptome sind demnach gestörtes Sensorium und Körperhaltung, Hypokinesie, Anorexie, Fieber, Hyperästhesie, Exzitationen, Hyperreflexie, Kolik und Speicheln, sowie Blindheit (Ludwig et al., 1988). Lange Zeit ging man davon aus, dass nur Pferde und Schafe natürlich an BD erkranken. Mittlerweile sind aber natürliche Infektionen, die mit ähnlichen Symptomen wie bei Pferd und Schaf einhergehen, bei verschiedenen Spezies bekannt. Dazu gehören Rinder, Ziegen, Esel, Luchs, Hase, Rehe, verschiedene

Kameliden, Affen (zusammengefasst in Dürrwald et al., 2006 und Staeheli et al., 2000) und Hunde (Weissenböck et al., 1998).

Wildvögel könnten zumindest für manche Bornastämme möglicherweise ein Reservoir darstellen. So wurden Kotproben an einem Vogelteich in Schweden gesammelt und in Kot von Stockenten (*Anas platyrhynchos*) und Dohlen (*Corvus monedula*) BDV-RNA mittels PCR nachgewiesen (Berg et al. 2001). Nicht feststellbar war allerdings, ob diese Vögel tatsächlich infiziert oder sogar eventuell erkrankt waren.

Ob BDV tatsächlich als Krankheitserreger bei Straußen Bedeutung besitzt, ist derzeit unklar. In Israel wurde bei jungen Straußen mit neurologischen Symptomen BDV im Gehirn nachgewiesen, allerdings nur bei 7 von 13 erkrankten Vögeln und auch in einem gesunden Strauß (Malkinson et al., 1993). Eine weitere Untersuchung über Todesursachen bei jungen Straußen bis zu einem Alter von drei Monaten, die von 1989-1993 in Israel durchgeführt wurde, ergab, dass dieses paretische Syndrom knapp zehn Prozent der Verluste in diesem Zeitraum ausmachte. Das vermutete BDV wurde mittels Immunfluoreszenz, und dabei in einem Referenzlabor in Deutschland identifiziert (Ashash et al., 1996). Dieses paretische Syndrom scheint derzeit aber in Israel keine Bedeutung mehr zu besitzen, und weitere Untersuchungen wären wünschenswert.

Hinsichtlich einer Übertragung zwischen Haustieren wird derzeit allgemein angenommen, dass ein Tierreservoir, am wahrscheinlichsten ein Nagerreservoir existiert, da die Erkrankung trotz zunehmenden Handels auf endemische Gebiete beschränkt bleibt, nur sporadisch und zudem gehäuft im Frühsommer auftritt, was dann der Zeit entsprechen würde, in der Reservoir und Wirt am häufigsten aufeinander treffen (Staeheli et al., 2000). Ende der 70er Jahre schlugen horizontale Übertragungsversuche von Schaf zu Schaf oder zwischen Schaf, Rind und Pferd fehl (dargestellt in Staeheli et al., 2000). Auch die epidemiologischen Gegebenheiten deuten auf eine vektorgebundene oder eine komplexere Übertragung hin, bei der mindestens ein Verbindungsglied („link“) ortsständig ist (Kolodziejek et al., 2005, Dürrwald et al., 2006). Bestätigt wird diese Annahme durch Untersuchungen in einem endemischen Bornagebiet in der Schweiz, wo Feldspitzmäuse (*Crocidura leucodon*) als Reservoir identifiziert wurden. Dabei wurden die Gehirne von drei Feldspitzmäusen mittels Immunhistochemie und RT realtime PCR positiv getestet, während 98 Gehirne verschiedener anderer

Mäusespezies negativ waren. Diese Ergebnisse wurden in einem zweiten unabhängigen Labor durch konventionelle PCR bestätigt. Die ermittelten BDV-Gensequenzen wurden mit denen von zwei an Borna verstorbenen Pferden aus demselben Gebiet verglichen und wiesen eine Sequenzidentität von 99,9% auf. Zumindest für dieses endemische Gebiet wurde damit eine Reservoirspezies identifiziert (Hilbe et al., 2006).

Borna disease ist mit wenigen Ausnahmen regelmäßig in endemischen Gebieten aufgetreten. Die in diesen endemischen Gebieten isolierten Viren zeigen eine hohe Genomgleichheit unabhängig vom Jahr ihrer Isolation und Wirtsspezies. Für Europa ergaben sich fünf genetische Cluster, die bestimmten Regionen zuzuordnen waren: 1) Liechtenstein, Teile von Österreich und der Schweiz sowie das Rheintal. 2) Westdeutschland. 3) Bayern. 4) Sachsen-Anhalt und Nord-Sachsen. 5) gemischte Gruppe, hauptsächlich Thüringen und Niedersachsen (Kolodziejek et al., 2005). Der bisher einzige Stamm aus einem nicht-endemischen Gebiet wurde in der Steiermark in Österreich aus einem Pony isoliert. Der dort nachgewiesene neue Subtyp No/98 besaß auf Nukleotidebene Unterschiede zum Referenzstamm von mehr als 15%. Dies zeigte, dass das BDV-Genom variabler ist als bisher angenommen und sich unbekannte Stämme bisher eventuell einer Detektion mittels PCR entzogen haben (Nowotny et al., 2000). Von einigen Autoren wird, ausgehend von den endemischen Regionen in Deutschland, eine weltweite Verbreitung angenommen (Taniyama et al., 2001). Unerwarteter Weise sind aber BDV-Stämme, die in Iran, Taiwan, Japan und USA detektiert wurden, in ihrer Nukleotidsequenz mit den europäischen Stämmen fast identisch, so dass Laborkontaminationen nicht sicher ausgeschlossen werden können (Staeheli et al., 2000). Denkbar wäre allerdings auch, dass eben nur diese Stämme mit den bisherigen Testmöglichkeiten detektiert werden können.

Die Übertragung und Ausbreitung des neurotrophen Borna disease Virus im Wirt ist noch nicht ganz geklärt. Ausgeschieden wird BDV über verschiedene Körpersekrete. Das Virus wurde in frischem Urin von infizierten Ratten (Sauder und Staeheli, 2003), sowie in Tränen- und Nasentupfern von Schafen nachgewiesen (Vahlenkamp et al., 2002). Auch eine vertikale Übertragung wird bei der Borna disease vermutet. Diese wurde sowohl bei einer natürlich infizierten Stute beschrieben (Hagiwara et al., 2000) als auch experimentell im Mausmodell gezeigt (Okamoto et al., 2003).

In den Körper und in das Zielorgan, das Gehirn, gelangt BDV höchstwahrscheinlich über die Riechschleimhaut und das olfaktorische System, wie im Rattenmodell gezeigt wurde. Eine anatomische Besonderheit des olfaktorischen Epithels liegt darin, dass es die einzige Stelle im Körper ist, an der Neurorezeptoren in direktem Kontakt mit der Außenwelt stehen (Morales et al., 1988). Weiterhin findet dort Aufnahme und transsynaptischer Transport von exogenen Substanzen direkt in den frontalen Kortex statt ohne, wie sonst üblich, über den Thalamus geschaltet zu werden. Die olfaktorische Aufnahme ist für zahlreiche andere, neurotrope Viren bekannt wie zum Beispiel für Lyssa- oder Herpesviren (Mori et al., 2005), die sich dann intraaxonal und vorwiegend anterograd ausbreiten.

2.2.1.2 Histopathologie und Immunpathogenese

Wie oben beschrieben gelangt BDV vermutlich über den N. olfactorius ins limbische System (Morales et al., 1988). Dort vor allem betroffen ist der Gyrus cinguli und der Nucleus caudatus. Außerdem findet man das Virus in großer Menge im Hippocampus, in der Amygdala, in den temporo-basalen Cortices und im Hirnstamm. Gar nicht oder nur wenig betroffen ist in der Regel das Kleinhirn (Ludwig et al., 1988, Gosztanyi, 2008). Histologisch dominiert eine lymphozytäre Meningoenzephalitis, begleitet von Neurodegeneration und Mikrogliaaktivierung, wobei die Mikroglia für die Neuronendegeneration verantwortlich sein sollen (Ovanesov et al., 2008). Bereits 1909 beschrieben Jost und Degen charakteristische, eosinophile, intranukleäre Einschlüsse, die zwar nicht immer gefunden werden, aber falls sie da sind als pathognomonisch für die Bornasche Krankheit gelten (Ludwig et al., 1988).

Für *in vivo* Versuche zur Untersuchung der Pathologie und Aufklärung der pathogenetischen Mechanismen hat sich das Rattentiermodell bewährt. Adult infizierte immunkompetente Ratten erkranken nach einigen Tagen in einer ersten akuten Phase, die auch als hyperaktiv-aggressive Phase beschrieben wurde und etwa 2-3 Wochen dauert. Danach geht die Erkrankung in die chronisch-apathe Phase über, in der die Ratten entweder abmagern oder adipös werden, phlegmatisch sind und häufig erblinden. Die genauen Ursachen für die Blindheit sind unbekannt, sie könnte auf den Schwund von Neuronen der inneren und äußeren Körnerschicht der Retina zurückzuführen sein (Narayan et al., 1983a). Im Unterschied dazu erkranken neonatal infizierte Ratten und immunsupprimierte

Ratten nicht (Narayan et al., 1983a). In ähnlicher Weise unterscheidet sich je nach Status des Immunsystems auch die Virusverteilung im Körper. So ist bei immunkompetenten Ratten in der akuten Phase das BD-Virus nur in neuronalen Geweben nachweisbar, während es in der chronischen Phase in vielen nicht-neuronalen Geweben zu finden ist (Shankar et al., 1992). Bei immunsupprimierten adulten Ratten wird ebenfalls der strikte Neurotropismus aufgehoben (Stitz et al., 1991). Daher stellt sich die Frage, ob die generelle Annahme des Neurotropismus von BDV aufrecht zu erhalten ist oder ob diese Feststellung nur für die hauptsächlich und ursprünglich nachgewiesenen natürlichen Wirtsspeziesspezies Pferd und Schaf zutrifft.

Allgemein anerkannt ist, dass Symptome der Bornaschen Krankheit nicht direkt durch das Virus, sondern durch die Immunreaktion des Wirtes hervorgerufen werden. Wichtig in der Pathogenese ist dabei das Einwandern von mononukleären Immunzellen ins ZNS, was mit einer Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke einhergehen muss, da diese sonst nicht für Zellen passierbar ist. Im Mausmodell wurde erfolgreich dargestellt, dass Peroxynitrite dafür verantwortlich sind. Diese entstehen in einer Reaktion aus NO-Radikalen und Superoxidradikalen, welche wahrscheinlich im Rahmen des Entzündungsprozesses gebildet werden. Die genaue Bedeutung der Peroxynitrite in der Neuroimmunologie ist derzeit allerdings noch unbekannt (Hooper et al., 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass auch das Komplementsystem bei der Entzündungsreaktion und damit bei der Pathogenese eine entzündungsfördernde Rolle spielt (Dietzschold et al., 1995). CD8⁺ T-Zellen werden als die wesentlichen zellulären Mediatoren der Erkrankung angesehen (Hausmann et al., 2004, Engelhardt et al., 2005). Nichtsdestotrotz scheinen auch die CD4⁺ T-Helferzellen je nach exprimiertem Zytokinmuster entweder protektiv oder destruktiv wirken zu können (Richt et al., 1994), wobei die Reaktion der CD4⁺ Zellen wiederum von den CD8⁺ Zellen abhängig ist (Hausmann et al., 1999). Die CD8 T-Zellen sollten eigentlich eine Virusausbreitung verhindern, indem sie infizierte Zellen angreifen und abtöten. Wenn aber schon zu viele Gehirnzellen infiziert sind, verursachen sie eine schwere Meningoenzephalitis (Stacheli et al., 2010).

In der akuten Phase steigen die neurotoxischen Zytokine IL-1 und TNF α passend zum Erkrankungshöhepunkt stark an, während sie in der chronischen Phase

wieder deutlich sinken und dafür IFN γ ansteigt. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass IFN γ durch Zell-Schutz-Mechanismen eine Symptommilderung hervorruft (Shankar et al., 1992). Leicht verletzbare hippocampale CA 1 Neurone könnten so vor toxischen Substanzen der CD8 $^{+}$ Zellen geschützt werden (Richter et al., 2009). Die oben genannten proinflammatorischen Zytokine scheinen außerdem die induzierbare NO-Synthase in Korrelation zum Entzündungsgeschehen zu aktivieren (Zheng et al., 1993). Dadurch werden Gewebeschäden im ZNS hervorgerufen, wie es auch für andere Krankheiten, zum Beispiel die Tollwut, beschrieben wurde (Akaike et al., 1995). Für die Änderung der Immunantwort von einem zellulären, TH1 dominierten Profil in der akuten Phase zu einer TH2–humoral begünstigten Antwort in der chronischen Phase wird ein Shift im Zytokinmuster verantwortlich gemacht. Die suppressiv wirkenden Zytokine IL-4 und TGF β sind beide in der chronischen Phase stark erhöht. Auch histologisch kann man den Rückgang der Entzündungszellen beobachten, da in der chronischen Phase weit weniger Infiltrate gefunden werden als in der akuten Phase (Hatalski et al., 1998).

Die Bedeutung der humoralen Immunantwort im Krankheitsgeschehen ist weitgehend ungeklärt. In der akuten Phase findet man Antikörper (Ak) gegen die löslichen Antigene N und P. Neutralisierende Ak sind gegen das M- und G-Protein gerichtet und treten erst in der chronischen Phase der Erkrankung auf (Hatalski et al., 1995, Furrer et al., 2001). In experimentell infizierten, immuninkompetenten Ratten verhinderte eine passive Immunisierung in Form von neutralisierenden Ak eine Virusausbreitung auf nicht-neuronale Gewebe (Stitz et al., 1998). Insgesamt ist jedoch die Spezifität der serologischen Assays (ELISA, IFA) unklar, da diese meist primär hinsichtlich ihrer Sensitivität optimiert wurden und Vergleiche beispielsweise mit PCR oder anderen Methoden fehlen. Außerdem gibt es keine Angaben zu möglichen Kreuzreaktionen und die Ergebnisse unterschiedlicher Labore bezüglich Sensitivität und Spezifität variieren zum Teil erheblich und stellen damit serologische Assays in Frage (Staeheli et al., 2000).

Welche intrazellulären Signalwege durch BDV beeinflusst werden, ist nur ansatzweise untersucht und verstanden. Wie verschiedene andere Viren versucht BDV der antiviralen Funktion von IFN zu entgehen. Die IFN-Produktion startet, wenn virale Nukleinsäuren entweder im Zytosol oder in Endosomen entdeckt

werden. Obwohl die Replikation von BDV vor allem im Kern stattfindet, wird der Start der IFN-Produktion allein dadurch nicht ausreichend verhindert. Im Zytosol sind für die Auslösung der IFN-Produktion RIG-1-Rezeptoren zuständig, die vor allem Einzelstrang-RNA mit einer ungeschützten Triphosphatgruppe am 5'-Ende oder kurze doppelsträngige RNA erkennen. Sie reagieren aber wahrscheinlich auch auf die im Zytosol lokalisierten Ribonucleoproteinkomplexe von BDV mit einer Induktion der IFN-Produktion (Schneider et al., 2007). Im Endosom dagegen übernehmen toll-like-Rezeptoren die Aufgabe der Erkennung. Das BDV-P-Protein interagiert mit dem Enzym (TBK1-kinase) der RIG-1-abhängigen Signaleinheit und verhindert dadurch die virusinduzierte IFN β -Produktion (Planz et al., 2009). Außerdem besitzt BDV kein triphosphoryliertes, sondern nur ein monophosphoryliertes 5'-Ende der RNA, so dass es nicht von RIG-1-Rezeptoren erkannt wird (Schneider et al., 2007). Zudem hemmt BDV den Transkriptionsfaktor NF κ B, der bei anderen Virusinfektionen eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der angeborenen Immunabwehr spielt, somit aber bei einer akuten BDV-Infektion nicht aktiviert wird. Darüber hinaus gibt es noch eine Vielzahl von BDV-Interaktionen, deren Bedeutung weitgehend ungeklärt ist. Dazu gehören beispielsweise Eingriffe in den Zellzyklus, Interaktionen mit dem Kernprotein Amphoterin, dem MAP-Kinase Signalweg, der Proteinkinase C oder dem Raf/MEK/ERK Signalweg (Bourteele et al., 2005).

2.2.2 Borna disease virus

Das Borna disease virus wurde erstmalig 1926 von Zwick et al. aus Pferdegehirnmaterial isoliert und in Kaninchen passagiert. Es wird als 80-100 nm großes, neurotropes, nicht-zytopathisches Virus mit einer Replikationszyklusdauer von ungefähr zwei Tagen beschrieben. In getrocknetem oder gefrorenem Zustand ist es unter Umständen über Jahrzehnte stabil. Auch gegenüber Fäulnis zeigt es eine ausgeprägte Widerstandsfähigkeit. Dagegen ist es im sauren Bereich (< pH 4) labil und gegenüber Hitze empfindlich. Einmaliges Aufkochen oder zehnminütiges Erhitzen bei 70°C genügen um BDV abzutöten. Auch mit Hilfe von UV-Licht kann es zuverlässig inaktiviert werden (Heinig, 1969, Danner und Mayr, 1979).

Als Desinfektionsmittel ungeeignet stellten sich Kaliumpermanganat und

Kalkmilch heraus. Auch Natronlauge oder Phenole sind nur in hohen Konzentrationen wirksam. Gut geeignet sind chlorabspaltende Chemikalien wie Formalin oder Chloramin (Heinig, 1969).

2.2.2.1 Genomaufbau und Virusproteine

Das Borna disease virus gehört in die Ordnung der *Mononegavirales*. Wie dieser Name schon andeutet umfasst diese Ordnung Einzelstrang-RNA Viren mit negativer Strangorientierung. Dazu gehören die Familien der *Paramyxo*-, *Rhabdo*-, *Filo*- und *Bornaviridae*, wobei BDV bis vor der Entdeckung des aviären Bornavirus der einzige Vertreter der letztgenannten Familie war. Weitere gemeinsame Charakteristika der Viren dieser Ordnung sind das lineare, nicht-segmentierte Genom, die RNA-abhängige RNA-Polymerase, ein helikales Nucleokapsid, Kern- und Hüllproteingene sowie die Replikation durch Synthese des positiv-Antigenoms (Pringle et al., 1991). Mit 8910 Nukleotiden ist das BDV-Genom kleiner als das anderer Vertreter der *Mononegavirales*. BDV sind sphärisch, behüllt und mit Spikes ausgestattet, haben ein dünnes (4nm) Nucleokapsid und reproduzieren sich durch Zellbudding (Kohno et al., 1999). Bornaviren besitzen sechs offene Leserahmen (ORF), die in der Reihenfolge 3'-p40, p10, p24, gp 18, gp 94 und p190 – 5' angeordnet sind, wobei p10 mit dem nachfolgenden p24 überlappend liegt (Tomonaga et al., 2002). Im Unterschied zu anderen Negativstrangviren befindet sich nicht vor jedem Leserahmen eine Transkriptionsinitiationsstelle. Bei BDV gibt es nur drei Initiationstellen, die durch uracilreiche Sequenzfolgen gekennzeichnet sind (Schneemann et al., 1995). In der Ordnung der *Mononegavirales* sind eine Reihe von Möglichkeiten bekannt, die die Viren nützen um die eigene Genexpression zu steuern. Dazu gehören das RNA-Splicing, überlappende Transkriptionssignale, gezieltes Überlesen („readthrough“) von Initiationsstellen und der unterschiedliche Gebrauch von Translations- und Initiationscodons. Einmalig an BDV ist, dass es gleich alle diese Möglichkeiten nutzt (Schneemann et al., 1995).

P40 ist ein Strukturprotein, auch als Nucleocapsid (N)-Protein bezeichnet. Es kommt reichlich in infizierten Zellen vor und ist weder phosphoryliert noch glykosyliert (Briese et al., 1994). Interessanterweise liegt es in zwei Isoformen mit unterschiedlicher Masse von 38kDa und 39kDa vor. Beide Formen sind unterschiedlich lokalisiert. Die um 13 Aminosäuren längere 39kDa-Isoform ist fast

ausschließlich im Kern zu finden, während die 38kDa-Isoform sowohl im Zytoplasma als auch im Kern vorkommt (Pyper und Gartner, 1997). Am aminoterminalen Ende des 39 kDa großen N-Proteins findet sich die Kernlokalisierungssequenz, die der von Viren der Familie *Polyomaviridae* (Bsp. Simian virus 40) gleicht (Pyper und Gartner, 1997, Kobayashi et al., 1998). Das N-Protein interagiert über den Cdc2-cyclin B1 Komplex mit dem Zellzykluskontrollpunkt G2 – M und verursacht dadurch eine verlangsamte Zellteilung (Planz et al., 2009).

Der p24 ORF steht für das Gen, das für das Phospho (P)-Protein codiert. Dieses Protein wird als Cofaktor der viralen Polymerase angesehen (Tomonaga et al., 2002, Planz et al., 2009) und ist im Kern lokalisiert. Weiterhin interagiert es mit dem Kernprotein Amphoterin (HMGB1), welches an der Transkriptionsregulation und DNA-Reparatur beteiligt ist. Dadurch kommt es in der Wirtszelle zu einer Downregulierung des p53, eines wichtigen Regulators des Zellzyklus, das bei fehlerhaften Zellen die Apoptose auslösen kann (Planz et al., 2009).

Der p24 ORF überlappt mit dem p10 ORF. Dieser steht für das kleinste (10kDa) virale Protein, das X-Protein. Dieses Protein ist das erste nachgewiesene Mitochondrien-lokalisierte Protein eines RNA-Viruses. Es hemmt möglicherweise die Apoptose und würde dadurch das Überleben der Wirtszellen sichern oder zumindest verlängern (Poenisch et al., 2009).

Das nächste Gen, gp18, kodiert für das Matrix (M)-Protein, welches Membran-assoziiert ist (Briese et al., 1994). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Virusadsorption und der Knospung („budding“). Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich um ein glykosyliertes Protein handelt, wozu es mittlerweile allerdings konträre Ergebnisse gibt, die vehement darauf hindeuten, dass das M-Protein nicht glykosyliert ist (Kraus et al., 2001).

Das gp94 Gen kodiert für das Glyko (G)- Protein, das auch als Hüllprotein bezeichnet wird. Dieses Protein wird in zwei Formen exprimiert, als gp84 und als gp43. Beide Formen tragen zum Eintritt des Virus in die Wirtszelle bei. Gp84 ist für die Bindung an die Oberflächenrezeptoren zuständig, während gp43 die Fusion nach Internalisation des Virions veranlasst (Gonzalez-Dunia et al., 1998). Das G-Protein ist also maßgeblich an der Endozytose des Virus beteiligt und vermittelt somit die Infektiosität der Viruspartikel (Perez und de la Torre, 2005).

P190 codiert für das Large (L)- Protein. Dieses Gen nimmt über die Hälfte des Genoms ein und wird nur durch ein Überlesen der Terminationsstelle 3 exprimiert. Um so erstaunlicher ist es, dass es sich bei diesem Protein um die lebenswichtige RNA-abhängige RNA- Polymerase handelt (Schneemann et al., 1995).

2.2.2.2 Besonderheiten: Transkription und Persistenz

BDV transkribiert im Kern. Dies ist zwar bei verschiedenen Rhabdoviren der Pflanzen bekannt, aber einmalig bei den Negativstrang-RNA Viren der Tiere (Briese et al., 1992, Schneemann et al., 1995). Als genaue Lokalisation wird der Nukleolus angenommen (Pyper et al., 1998). Um die Transkription des Genoms durchführen zu können, bedient sich BDV der Splicingapparatur der Wirtszelle zur Synthese von mindestens sechs ersten, polyadenylierten RNAs unterschiedlicher Längen. Die nukleare Replikation bietet noch einen wesentlichen Vorteil. Angeborene Immunrezeptoren befinden sich entweder im Zytosol oder in Endosomen. Da der Lebenszyklus des Virus aber im Kern stattfindet, entgeht es der Erkennung durch diese Rezeptoren zwar nicht vollständig, aber weitgehend (Planz et al., 2009).

Eine Bornavirusinfektion verläuft nicht-zytolytisch und in der Regel persistent. Das Gehirn stellt einen gut geeigneten Ort für persistente Infektionen dar, da es vom restlichen Körper immunologisch isoliert ist und somit das Verbergen vor der Wirtsabwehr erleichtert wird (Stevenson et al., 1997). Die Mechanismen der Persistenz bei BDV sind noch nicht geklärt, aber es erscheint unwahrscheinlich, dass eine veränderte Genexpression die Ursache dafür ist, da sich der Virusgehalt im Gehirn im Laufe der Infektion nicht wesentlich verändert. Möglicherweise spielt die sich ändernde Immunantwort beim Übergang in die chronische Krankheitsphase eine Rolle. Die dabei entstehende TH1-Toleranz scheint von BDV induziert zu sein. Als Grund dafür kommt eine fehlende Kostimulation bei der BDV-Antigenpräsentation in Frage, wodurch die TH1-Abwehr inaktiv wird (Hornig et al., 2003). In weiteren Erklärungsversuchen wurde über die Rolle einzelner Virusproteine spekuliert. Die Interaktion des P-Proteins mit dem Kernprotein Amphoterin resultiert in einer Unterdrückung des p53. Eine Modulation dieses wichtigen Zellzyklus- und Apoptoseregulators könnte das Auftreten der Persistenz unterstützen (Zhang et al., 2003). Ebenso wird dem X-Protein eine grundlegende Funktion in der Apoptoseinhibition zugeschrieben. In

in vitro-Versuchen zeigten sich BDV-infizierte Zellen relativ resistent gegenüber verschiedener Apoptosestimuli, während Zellen, die mit einer BDV-X-Mutante infiziert waren, wesentlich anfälliger für den programmierten Zelltod waren. Die Apoptoseverhinderung ist wichtig für das Überleben der Zellen im Gehirn und trägt damit zur Persistenz der BDV-Infektion bei (Poenisch et al., 2009). Die Persistenz von RNA-Viren wird häufig mit ungleichmäßigen terminalen Nukleotiddeletionen an beiden Genomenden assoziiert, da dies die virale Replikation einschränken soll (Schneider et al., 2007). Dabei ist unklar, ob allein die Sequenzheterogenität der Enden die Persistenz beeinflusst (Rosario et al., 2005). Durch spezielles „Trimmen“ des 5'-Endes scheint BDV seine Genomamplifizierung einzuschränken und somit die Persistenz zu fördern. Zusätzlich verhindern die terminalen Nukleotiddeletionen die Erkennung durch das angeborene Immunsystem, da die entsprechenden Mustererkennungsrezeptoren (TLR, RIG-1) nicht mehr an diese verkürzten Sequenzen binden können. RIG-1 erkennt normalerweise das 5'-terminale Triphosphatende von RNA-Viren. Bei BDV wurde dieses aber zu einem Monophosphatende verkürzt. Diese geschickte Strategie die angeborene Immunabwehr zu umgehen begünstigt eine persistente Infektion (Schneider et al., 2005, Schneider et al., 2007).

2.2.3 Aviäres Bornavirus

2.2.3.1 Entdeckung und Charakteristika

Im August 2008 wurde die Entdeckung der aviären Bornaviren (ABV) erstmalig veröffentlicht. In einem panviralen microarray oder auch Virochip genannten Verfahren, zeigten sich bei fünf von acht in die ersten Untersuchungen einbezogenen PDD-Fällen, also bei über 60%, ein Bornavirus-Hybridisierungssignal. Auf diesem Chip befinden sich 70 Oligonukleotidsonden, die hochkonservierte Sequenzen aller bekannten Virusgruppen erkennen. Dieses Verfahren stellt somit ein sehr effizientes und unvoreingenommenes Screening nach viralen Nukleinsäuren dar. Durch Ultrahochdurchsatzsequenzierung wurde dann eine bornavirustypische Genomorganisation der beteiligten Erreger, aber gleichzeitig eine hohe Diversität zu den bisher bekannten Bornaviren nachgewiesen und eine neue Gattung, die aviären Bornaviren, erstmals

beschrieben. Dabei konnten wesentliche Merkmale der Familie *Bornaviridae* identifiziert werden. Dazu gehören die sechs ORFs, die sechs Proteine N, P, X, M, G und L, sowie die Anordnung von Initiations- und Terminationsstellen und ähnliche nicht-kodierende regulatorische Elemente, wie umgekehrte terminale Sequenzen oder Splicingsignale der Introns. Die Sequenzidentität der neuen Bornavirus-Gattung zum klassischen Bornavirus (BDV) betrug aber auf Nukleotidebene nur 64% (Kistler et al., 2008). Diese Ergebnisse wurden im gleichen Jahr durch Veröffentlichung unabhängiger Studien einer weiteren Forschergruppe bestätigt. Dabei wurden Gehirnproben von PDD-kranken Vögeln mittels Pyrosequenzanalyse untersucht und zwei verschiedene ABV- Stämme gefunden (Honkavuori et al., 2008). Dass tatsächlich ein kausaler Zusammenhang zwischen ABV und PDD existiert, wurde in einem Infektionsversuch an Nymphensittichen gezeigt. Sie wurden mit einem Gehirnhomogenat eines PDD-kranken Vogels infiziert (i.m., i.oc., i.n., oral), in dem 50 -130 nm große sphärisch geformte und behüllte Viruspartikel als ABV-4 identifiziert worden waren. Nach wenigen Wochen zeigten zwei der drei infizierten Vögel typische Symptome und mussten alsbald euthanasiert werden. In verschiedenen Geweben der Vögel wurde mittels PCR wiederum ABV-4 gefunden. Histopathologisch wurde bei allen drei Nymphensittichen PDD bestätigt. Die zwei Kontrollvögel, die ein Gehirnhomogenat eines gesunden Vogels erhalten hatten, blieben klinisch gesund und zeigten pathologisch und histologisch keine Hinweise auf PDD (Gancz et al., 2009b). Diese Infektionsversuche stützen ganz wesentlich die Ansicht, dass ABV tatsächlich der Erreger der PDD darstellt, auch wenn die verwendeten Vögel aus einem Bestand stammten, bei dem natürliche ABV-Infektionen vorkamen, wie im Rahmen dieser Studien (Gancz et al., 2009b) nachgewiesen wurde. Ein weiterer Infektionsversuch an zwei adulten Konuren gelang ebenfalls. Die Vögel wurden intramuskulär mit Zellkulturmaterial infiziert, das zuvor aus einem PDD-kranken Gelbbrustara isoliert worden war, und zeigten sowohl klinisch PDD als auch eine Serokonversion. Pathologisch und histologisch wurde PDD bestätigt (Gray et al., 2010).

Bereits bei der Erstbeschreibung durch Kistler et al. (2008) konnten die ABV-Isolate fünf verschiedenen Genotypen zugeordnet werden. In Europa wurden bisher am häufigsten die Genotypen ABV-2 und 4 nachgewiesen (Rinder et al., 2009, Weissenböck et al., 2009a). Die hohe genetische Diversität kann nicht auf

geographische Unterschiede zurückgeführt werden, denn ABV-4 beispielsweise wurde sowohl von Psittaziden aus den USA und Israel als auch aus Europa isoliert (Rinder et al., 2009, Weissenböck et al., 2009a). Kürzlich wurde der erste natürlich ABV-infizierte Kakadu in Japan beschrieben. Dieser war mit dem Genotyp ABV-2 infiziert, der zu den weltweit dominanten Genotypen gehört (Ogawa et al., 2011). Für RNA-Viren ist eine starke Heterogenität zu erwarten, da die RNA-abhängige RNA-Polymerase für ihre hohe Fehlerquote bekannt ist (Kistler et al., 2008). Mittlerweile ist noch ein weiterer Genotyp, ABV-6, beschrieben worden (Weissenböck et al., 2009a) und ein weiterer Stamm wurde bei einem Kanarienvogel festgestellt (Weissenböck et al., 2009b). Dies stellt die erste nicht-psittazine Spezies dar, in der das Virus nachgewiesen wurde.

ABV wurde bisher erfolgreich in Hühner- und Wachtelzelllinien sowie in DEF-Zellkultur (duck embryo fibroblasts) vermehrt (Rinder et al., 2009, Gray et al., 2010). Bisher nicht gelungen ist jegliche Infektion von Säugerzellkulturen mit ABV, woraus zumindest eine hohe Präferenz für aviäre Zellen gefolgert werden kann (Rinder et al., 2009), wenn nicht sogar die Unfähigkeit, Säugerzellen zu infizieren (Gray et al., 2010).

Mit Hilfe von PCR-Diagnostik konnte ABV sowohl im Kot als auch in Kloakentupfern nachgewiesen werden (Rinder et al., 2009). Bei der fäkalen Virusausscheidung scheint die Annahme einer fäkal-oralen Übertragung plausibel, wobei eine endgültige Bestätigung noch aussteht (De Kloet und Dorrestein, 2009, Lierz et al., 2009, Rinder et al., 2009, Kistler et al., 2010). Kürzlich erst beschrieben wurde die intermittierende Virusausscheidung im Kot. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurden Kotproben von fünf ABV-positiven Psittaziden mittels PCR untersucht, wobei der ABV-Nachweis im Mittel an drei Tagen gelang (Raghav et al., 2010). Ein natürlicher Ausbruch von PDD bei einem Hobbyzüchter ermöglichte eine genauere Untersuchung der Übertragbarkeit. Durch einen ABV-2 infizierten Neuzugang wurde PDD in den Bestand eingetragen. Von 46 Kontaktvögeln waren 12 in der RT-PCR ABV-2 positiv und 10 davon starben im Untersuchungszeitraum an PDD. Auch hier wurde ein fäkal-oraler Übertragungsweg angenommen (Kistler et al., 2010). ABV ließ sich aber nicht nur in Kloakentupfern und Kotproben nachweisen, sondern auch im Blut, hier aber möglicherweise mit geringerer Sensitivität. In einer Untersuchung von 24 mit ABV natürlich infizierten Vögeln wiesen Blutproben eine Detektionsrate

von 54% (13/24) auf, was deutlich niedriger war im Vergleich zu Kotproben mit 83% (20/24) Nachweishäufigkeit (Rinder et al., 2010). In einem anderen Fall konnte ebenfalls RNA im Blutplasma gefunden werden, womit eine virämische Phase gezeigt werden konnte. Gerade bei diesem Fall fand sich zusätzlich eine breite Gewebeverteilung von ABV, bei der eine Vielzahl der inneren Organe mittels PCR positiv getestet worden sind (Lierz et al., 2009). Dieser breite Gewebetropismus der aviären Bornaviren wurde in zahlreichen anderen Fällen ebenfalls beschrieben (Rinder et al., 2009, Weissenböck et al., 2009b, Kistler et al., 2010).

2.2.3.2 Nachweismöglichkeiten

Bis dato sind die Möglichkeiten aviäre Bornaviren zu diagnostizieren noch nicht ganz zufriedenstellend. So ist die *intra vitam* Diagnostik im Hinblick auf Bestandskontrolle und –zertifizierung vermutlich noch unsicher (De Kloet und Dorrestein, 2009).

Die PCR-Diagnostik ist eine recht zuverlässige und sensitive Möglichkeit ABV-RNA nachzuweisen. Bei der gezeigten Sequenzheterogenität der ABV ist es aber möglich, dass die Zielsequenzen der derzeit in der PCR verwendeten Primer abweichen und damit der RNA-Nachweis nicht gelingt. Bei der Durchführung dieser Tests wird extrahierte RNA zunächst mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Für die anschließende PCR stehen konventionelle Protokolle, also unter Einbeziehung einer Gelelektrophorese, für verschiedene Zielgene, und zwar für L-Gen, M-Gen und N-Gen, zur Verfügung (Kistler et al., 2008, Weissenböck et al., 2009a, Villanueva et al., 2010). Zusätzlich zur konventionellen PCR gibt es zwei Realtime PCR- Protokolle mit unterschiedlicher Primer-Sonden-Kombination, die den Vorteil der (semi-) quantitativen Bewertung haben und außerdem schneller durchzuführen sind. Ebenso wie bei der konventionellen PCR wird zuvor die RNA extrahiert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (Honkavuori et al., 2008). Allerdings kann im Unterschied zur konventionellen PCR mit den existierenden Protokollen der Genotyp ABV-2 nicht nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von PD Dr. Rinder).

Weiterhin wurde eine *in situ* Hybridisierung entwickelt, mit der sowohl genomische als auch mRNA im Gewebeschnitt dargestellt werden kann. Mittels

Digoxigenin- markierter Sonden wurde dadurch RNA von ABV-2 und -4 nachgewiesen, wobei mit den hier verwendeten Sonden allerdings keine Unterscheidung der Genotypen möglich war (Weissenböck et al., 2010).

Ebenfalls am Gewebeschnitt kann ein Nachweis von ABV mittels Immunhistochemie (IHC) geführt werden. Hier wird das Antigen im Gewebe durch eine Reaktion mit Antikörpern dargestellt. Dazu wird auf Gewebeschnitte ein spezifischer Erstantikörper gegeben, an den dann ein konjugierter Brückenantikörper bindet. Anschließend wird eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion durchgeführt. Verschiedene BDV-Ak wurden auf ihre Reaktion mit ABV getestet. Die monoklonalen BDV-Ak Bo18 und 38/17C1, die gegen das N-Protein gerichtet sind, zeigten keine Kreuzreaktivität mit ABV, während polyklonale BDV-Ak gegen das P-Protein erfolgreich zum Nachweis von ABV verwendet wurden (Rinder et al., 2009, Weissenböck et al., 2009a). Weiterhin wird derzeit an der Entwicklung serologischer Tests gearbeitet. Hier stellt sich die Situation möglicherweise anders dar als bei der Diagnostik von Säugerborna-viren (BDV). Beim Nachweis von Antikörpern gegen BDV werden offenbar in der Regel nur sehr niedrige Antikörper-Titer ausgebildet, die Testsysteme daher auf eine hohe Sensitivität eingestellt werden musste, was eine geringe Spezifität der Tests zur Folge hat (Staeheli et al., 2000). Ein für ABV entwickelter ELISA, bei dem rekombinantes N-Protein als Antigen verwendet wurde, zeigte allerdings bei zwei Aras relativ hohe Titer, und die Spezifität der Reaktion wurde in einem Western Blot bestätigt (De Kloet und Dorrestein, 2009). Bei einem von einer anderen Arbeitsgruppe entwickelten Western Blot wurde ein Lysat aus mit ABV-4 infizierten Entenfibroblasten (duck embryo fibroblast, DEF) Kulturen als Antigen verwendet. In diesem Test wurden zwar die histologisch bestätigten PDD-Fälle der Versuchsgruppe in 90% der Fälle erkannt, aber es wurden nur bei 33% der in der PCR positiven Vögel Antikörper nachgewiesen. Ähnlich ungünstig verhielt es sich mit der Spezifität. 82% der in der Histologie als negativ eingestuften Vögel wurden im Western Blot ebenfalls seronegativ getestet. Im Vergleich mit der PCR ergab sich allerdings nur eine Spezifität von 30% (Villanueva et al., 2010). Dieser Western Blot zeigte demnach zwar mit der Histologie gut übereinstimmende Ergebnisse, aber im Vergleich zur PCR wichen die Resultate deutlich ab. Aufgrund eines bisher fehlenden Goldstandards für die Diagnose einer ABV-Infektion und der damit verbundenen Schwierigkeit, einen

Vogel für definitiv ABV-frei zu erklären, waren jedoch Sensitivität und Spezifität des Western Blots (allerdings auch die der verwendeten PCR) nicht genau zu bestimmen und wurde die Bedeutung der Serologie sehr zurückhaltend bewertet (Villanueva et al., 2010). Auch die Immunfluoreszenz kann, neben ELISA und Western Blot, zum Nachweis von Antikörpern gegen Bornaviren verwendet werden. So wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) entwickelt, bei dem BDV als Antigen verwendet wurde, der also auf Kreuzreaktionen von ABV-Antikörpern mit BDV-Antigen beruht. Die Validierung erfolgte an einem Papageienbestand aus 77 Tieren (Herzog et al., 2010). Allerdings brachte dieser IFT im Vergleich zur PCR nur wenig überzeugende Ergebnisse, da sowohl positive als auch negative Ergebnisse keine zufriedenstellende Übereinstimmung zeigten. Zudem ist die IFT nicht automatisierbar und daher für Massenuntersuchungen weniger geeignet und gilt als nicht objektivierbar. Die Tatsache, dass eine Immunfluoreszenz für ungeübte Augen oftmals schwer zu interpretieren ist, birgt dann die Gefahr falscher Interpretation der Ergebnisse.

Beim derzeitigen Kenntnisstand über ABV-Infektionen in Bezug zur klinischen Erkrankung der PDD ist die Interpretation diagnostischer Befunde von ABV-Nachweistests häufig problematisch. Auch wenn ABV mittlerweile als Erreger der PDD angesehen wird, ist es wichtig, zwischen der Diagnose einer Infektion mit ABV und der Feststellung einer Erkrankung, der Neuropathischen Drüsenmagendilatation, zu differenzieren. Gerade das Problem der ABV-seropositiven, aber klinisch gesunden Vögel, wirft Fragen auf, die derzeit nicht beantwortet werden können. So muss zwar von einer Infektion der Vögel mit ABV ausgegangen werden, eine Prognose zum möglichen Krankheitsausbruch kann aber noch nicht gegeben werden. Nichtsdestotrotz haben serologische Tests wie ELISA oder Western Blots einen Platz in der Diagnostik, da sie am lebenden Tier Informationen zum Infektionszustand liefern (Villanueva et al., 2010). Mittels ELISA wurde gezeigt, dass ein Soldatenara (*Ara militaris*) Antikörper über einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren besaß. Außerdem schied dieser Vogel zum Zeitpunkt der Untersuchung das Virus im Kot aus, wie durch PCR nachgewiesen wurde. Daraus wird ersichtlich, dass Vögel über längere Zeit mit dem Virus leben und es verbreiten können (De Kloet und Dorrestein, 2009).

Im Moment gilt als Empfehlung für die *intra vitam* Diagnostik von ABV eine Kombination aus serologischen Tests und PCR. Damit wird die

Wahrscheinlichkeit, eine vorliegende ABV-Infektion zu erkennen, als maximal eingeschätzt.

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tierauswahl und Probengewinnung

Für diese Arbeit wurden acht Papageienvögel untersucht, die im Zeitraum von November 2008 bis August 2010 in der Klinik für Vögel in Oberschleißheim mit der Verdachtsdiagnose PDD gestorben sind oder euthanasiert wurden. Dabei handelte sich um fünf männliche adulte Psittaziden, und zwar um zwei Kongo-Graupapageien, *Psittacus erithacus erithacus* (#7560, #14400), einen Rosakakadu, *Eolophus roseicapillus* (#11851), einen Edelpapagei, *Electus roratus* (#7611) und einen grünen Kongopapagei, *Poicephalus gulielmi* (#9264) sowie drei weibliche adulte Psittaziden, die als Gelbnackenamazone, *Amazona auropalliata* (#113), Mohrenkopfpapagei, *Poicephalus senegalus* (#7856) und Hybridara, *Ara* (#11361) klassifiziert worden waren. Weiterhin wurde ein juveniler Gelbrustara, *Ara ararauna* (#12046), der nicht an PDD gestorben war, als Kontrolltier in die Untersuchung mit einbezogen.

Die Tierkörper wurden nach dem Tod gekühlt gelagert und innerhalb von 24h einer pathologischen Untersuchung unterzogen. Dabei wurden, wenn möglich, folgende Organproben entnommen: Großhirn, Kleinhirn, Rückenmark, Auge mit Sehnerv, Kropf, Drüsenmagen, Muskelmagen, Darm, Lunge, Leber, Pankreas, Milz, Herz, Niere, Nebenniere, Schilddrüse, Knochenmark, Gonaden, Muskel und Haut mit Feder. Die Proben wurden für die PCR-Diagnostik nach Organen getrennt in Sechs-Loch-Platten gelegt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C gelagert. Für die histologische Untersuchung wurden Organstücke in 3,7%-igem Formalin und für die immunhistochemische Untersuchung in Zamboni-Medium fixiert. Dieses letztgenannte Medium besteht aus Paraformaldehyd, Sörensenpuffer und 1,3%-iger Pikrinsäure und wurde aufgrund seiner antigenschonender Eigenschaften gegenüber Formalin bevorzugt (Lang, 2006).

3.2 Herstellung histologischer Schnitte

Die Formalin- und Zamboni-fixierten Organstücke wurden nach 24 - 48h Fixierungszeit in einem Einbettungsautomaten der Bauart Tissue-Tek VIP (Sakura

Diagnostics) in Paraffinwachs eingebettet. Knochen- und knorpelhaltige Proben wurden vor dem Einbetten zusätzlich einer Entkalkung unterzogen. Dabei wurden Proben für die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung mit Osteomoll (Merck) entkalkt, während vor der immunhistochemischen Färbung Osteosoft (Merck) verwendet wurde. Dieser Entkalker enthält Komplexbildner, die die Kalziumionen des Gewebes binden, ohne Antigenstrukturen zu zerstören, so dass anschließende immunologische Reaktionen weniger stark beeinträchtigt werden. Mit einem Rotationsmikrotom von Reichert-Jung, Modell 1140/autocut, wurden dann mehrere 2-4 µm dicke Schnitte jedes Paraffinblockes angefertigt. Für die Immunhistochemie wurden sie auf Adhäsionsobjektträger (Superfrost PLUS, ULTRAPLUS, GOLD, Menzel Gläser) aufgebracht, während für die HE-Färbung geschliffene Glasobjektträger (Superfrost, Menzel) verwendet wurden.

3.3. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die HE-Färbung erfolgte nach dem Standardprotokoll der Klinik für Vögel. Die absteigende Alkoholreihe begann mit zweimal fünf Minuten Xylol, gefolgt von Isopropylalkohol, 96%-, 80%- und 70%igem Ethanol für je drei Minuten. Nach kurzem Abspülen in Wasser wurden die Schnitte für vier Minuten im Hämalaun (Mayer's Hämalaun-Lösung, Applichem) gefärbt und anschließend vier Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Dann erfolgte die Eosinfärbung (Eosin-G-Lösung, 0,5% wässrig, Merck) für drei Minuten. Die Farbreste wurden in Wasser abgespült. Danach wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe analog zur absteigenden Alkoholreihe dehydriert.

Die Beurteilung und Auswertung der Schnitte erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Gerlach (München) und Frau Dr. Schulz (Leipzig).

3.4 Immunhistochemische Färbung

3.4.1 Optimierung der Erstantikörperreaktion

Für die Immunhistochemie wurde ein polyklonaler Anti-ABV-N-Protein-Antikörper verwendet, der von Prof. Dr. Bernd Kaspers, Institut für Tierphysiologie der LMU München, zur Verfügung gestellt wurde und in einem Kaninchen gegen rekombinantes ABV-N- Protein produziert worden war. Das zur

Immunisierung verwendete rekombinante Protein wurde als Histidin markiertes ABV-N- Protein in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt (Reuter et al., 2010). Es wurde von Prof. Dr. Peter Stäheli, Department Virologie der Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt.

Da bei polyklonalen Antikörpern Antikörperchargen untereinander differieren, wurde zunächst die optimale Verdünnung des Serums ermittelt. Das Kaninchenserum wurde dabei mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit Ziegenserum und 10%igem Natriumazid (NaN₃) verdünnt. Drei Verdünnungsstufen der Antikörperstammlösung, und zwar 1:500, 1:1000 und 1:2000, wurden in parallelen Durchgängen bei der immunhistochemischen Färbung verwendet. Die Verdünnung mit dem besten Signal-Hintergrund-Verhältnis, bei der also eine deutliche spezifische Färbung ohne unspezifische Hintergrundfärbung zu erkennen war, wurde bei den anschließenden Untersuchungen der Papageien verwendet.

3.4.2 Durchführung und Negativkontrollen

Die Paraffinschnitte wurden zunächst im Ofen bei 80°C für etwa eine Stunde inkubiert, dabei wurde das Paraffin großteils entfernt. Anschließend erfolgte die Entparaffinierung und gleichzeitige Rehydrierung der Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe unter Verwendung von 96, 80 und 70 %igem Ethanol. Zur kompetitiven Hemmung endogener Peroxidasen und damit zur Reduktion falsch-positiver Ergebnisse wurden die Schnitte 13 Minuten in eine 0,3%ige Wasserstoffperoxidlösung getaucht. Danach wurden die Schnitte in 1%igem Ziegenserum für 45 Minuten inkubiert, um freie, unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blockieren. Als nächster Schritt erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper für mindestens 60 Minuten. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte in PBS wurde der Brückenantikörper, ein biotinyliertes anti-Kaninchen Immunglobulin G (Vector Laboratories), für 30 Minuten bei einer Verdünnung von 1:100 aufgebracht. Die Färbung wurde mit dem Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Visualisierung der Farbreaktion wurde das braune Chromogen 3,3-Diaminobenzidin verwendet. Alternativ wurde für melaninhaltige Gewebe der rote Farbstoff des Peroxidase Substratkits Vector NovaRED (Vector Laboratories) gewählt. Schließlich erfolgte

die Gegenfärbung mit Hämalaun für fünf Sekunden und dessen Fixierung mittels Ammoniak. In der folgenden aufsteigenden Alkoholreihe (siehe 3.3.) wurden die Schnitte dehydriert und dann mit Eukitt (Kindler) eingedeckelt.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Lichtmikroskop von Leitz (Modell Aristplan). Positiv gewertet wurde die spezifische Braun- oder Rotfärbung von Zellen und Zellkernen. Eine semiquantitative Bewertung wurde wie folgt durchgeführt: +++ wurde verwendet, wenn ein oder mehrere Zelltypen massiv betroffen waren. ++ bedeutete, dass ein Zelltyp zum überwiegenden Teil oder zwei Zelltypen zum Teil betroffen waren. + zeigte an, dass ein Zelltyp wenig bis vereinzelt betroffen war. – entsprach einem negativen Befund.

Als Negativkontrollen wurden Schnitte mitgeführt, die statt des Detektionsantikörpers mit Präimmunserum inkubiert wurden. Das Präimmunserum stammte von dem Kaninchen, in dem der Detektionsantikörper produziert wurde, und war vor der Immunisierung des Kaninchens entnommen worden. Da dieses Serum im Wesentlichen die gleiche Zusammensetzung hat, exklusive Detektionsantikörper, werden damit unspezifische Bindungen aufgezeigt und Hintergrundfärbung kann erkannt werden. Zusätzlich wurden Gewebeschnitte von einem ABV-negativen Vogel als weitere Negativkontrollen, hier dann unter Verwendung des Immunserums, in die Untersuchung mit einbezogen.

Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die Schnitte mit einer Kamera (Leitz, DC 300F) fotografiert und digital gespeichert.

3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

3.5.1 RNA Extraktion und reverse Transkription

Die Isolierung der RNA aus den Organ- und Gewebeproben erfolgte mit dem RNeasy Minikit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Von jedem Gewebe wurde ein 2-3 mm Würfel eingesetzt, das in etwa der maximal zu verarbeitenden Menge von 20-30 mg entspricht. Nach der Homogenisierung des Gewebes wurden die darin enthaltenen Nukleinsäuren in einer Säule an eine Silikamembran gebunden. Nach Durchführung von Waschschritten wurden die Nukleinsäuren in einem Volumen von 30µl eluiert. Die extrahierte RNA wurde dann mit random

hexamer Primern (500ng/ μ l, Roth, Karlsruhe) und der M-MLV Reversen Transkriptase (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 0,3 μ l der random Primer, 0,25 μ l dNTP (25mM) und 6,45 μ l Wasser zu 5 μ l RNA pipetiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei 65 °C wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und 7 μ l eines Mastermixes, bestehend aus 4 μ l 5x-Puffer, 2 μ l DTT (0,1M) und 1 μ l RNase-Inhibitor (30u/ μ l) hinzugegeben. Bei der darauffolgenden 37°C Inkubation wurde dann 1 μ l (200 u/ μ l) reverse Transkriptase hinzugefügt, woraufhin dann die Umschreibung der RNA während der nächsten 50 min erfolgte. Abschließend wurde die Reaktion bei 70°C gestoppt.

3.5.2 Realtime PCR

Für die Durchführung der Realtime PCR wurde eine HotstarTaq Polymerase (Qiagen) und das Primer/Sonden Set 1034/1322 mit folgenden Primern verwendet: forward: 5'-CAG ACA GCA CGT CGA GTG AGA-3', reverse: 5'-AGT TAG GGC CTC CCT GGG TAT-3'. Die Sonde hat folgende Sequenz: 5'-6FAM-AGG TCC CCG CGA AGG AA GCG A-TAMRA. (Honkavuori et al., 2008). Für einen 25 μ l Ansatz wurden jeweils 1 μ l cDNA eingesetzt und 0,15 μ l der Primer (50 μ M), 0,25 μ l einer 20 μ M Sonde und 1,5 μ l einer 25mM Magnesiumchlorid-Lösung verwendet, dies entspricht unter Einbeziehung der Mg-Konzentration im PCR-Puffer einer Magnesiumionen-Endkonzentration von 3 mM im Ansatz. Als Kontrollen wurden jeweils Negativ-Extraktionskontrollen und zwei Positivkontrollen mitgeführt: ein ABV-RNA-haltiger Ansatz wurde bereits bei der RT-Reaktion mitgeführt, außerdem wurde als Positivkontrolle in der Realtime PCR ein Plasmid mit einligiertem PCR-Produkt des ABV-Stammes 1034 verwendet. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Thomas Briesse und Dr. Kirsi Honkavuori, Columbia University New York, USA, zur Verfügung gestellt. Die PCR-Reaktion wurde mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95°C für 15 Minuten. In 50 Zyklen wurden dann die Denaturierung bei 95°C, die Primeranlagerung bei 60°C und die Elongation bei 72°C für je 30 Sekunden durchgeführt. Verwendet wurde das realtime-PCR Gerät Stratagene MX 3000 P der Firma Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland). Eine Probe wurde als positiv gewertet, wenn die Fluoreszenzkurve bei sigmoidem Kurvenverlauf eine Grundlinie, die sich aus der

Hintergrundfluoreszenz ergab, überstieg. Der Zyklus, in dem die Grundlinie überschritten wird, wird als Schwellenzyklus („threshold cycle“) bezeichnet, er entspricht dem Ct-Wert. Je nach erreichtem Ct-Wert wurden die untersuchten Proben semiquantitativ bewertet. Bei einem Ct-Wert von unter 20 wurden sie als ++++ eingestuft, während bei einem Ct-Wert von 20 bis <25 das Ergebnis als +++, von 25 bis <30 als ++ und von 30 bis <35 als + beurteilt wurde. Bei einem Ct-Wert von 35 und größer wurden die Proben als (+) bewertet.

3.5.3 Konventionelle PCR und Sequenzierung

Ebenfalls unter Verwendung der Hotstar Taq Polymerase (Qiagen) diente die transkribierte cDNA als Vorlage für die Amplifikation des ABV-N-Gens unter Verwendung der PCR-Primer ABV_NconsF (forward) 5'-CCH CAT GAG GCT ATW GAT TGG ATT AAC G-3' und ABV_NconsR (reverse) 5'-GCM CGG TAG CCN GCC ATT GTD GG-3' nach Kistler et al. (2008). In einem Thermocycler der Firma SensoQuest, Göttingen, erfolgte die initiale Denaturierung bei 95°C für 15 Minuten. In 35 Zyklen wurden Denaturierung bei 94°C, Primeranlagerung bei 50° und Elongation bei 72° für je 30 Sekunden durchgeführt. Die finale Elongation erfolgte ebenfalls bei 72°C für 7 Minuten. Danach wurden die Proben bis zur Entnahme auf 4°C abgekühlt (Kistler et al., 2008). Pro 25 µl Reaktionsansatz wurden 1 µl cDNA, 2,5 µl 10 x Puffer (mit 15 mM MgCl₂), jeweils 0,2 µl 50 µM jedes Primers, 0,25 µl dNTP-Mix (25 mM each), 1,5 µl MgCl₂, 19,225 µl H₂O und 0,125 µl 5u/µl HotStar Taq.-Polymerase (Qiagen) eingesetzt.

Zur Darstellung einer Amplifikation wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid (0,1 µg/ml Agarosegel) sichtbar gemacht. Dazu wurde ein ethidiumbromidhaltiges, 2%iges Agarosegel in eine mit Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer gefüllte Laufkammer (peQ Lab Biotechnologie GmbH) gelegt. Die PCR-Ansätze wurden nach Zugabe eines 6x-Gelauftragspuffers (Roth) in die Geltaschen aufgetragen und die Gelelektrophorese bei 72 mA und 95 Volt für 1 Stunde 10 min durchgeführt. Als Größenstandard wurde eine 100 bp-Leiter (Invitrogen) mitgeführt. PCR-Produkte mit der erwarteten Bandengröße von 359 bp wurden aus dem Gel ausgeschnitten.

Zur Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wurde das QIAquick

Gelextraktionskit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde das die PCR-DNA-Bande enthaltene Gelstück ausgeschnitten und das Gel nach Zugabe des im Kit enthaltenen Puffers QG bei 50°C geschmolzen. Nach Zugabe von Isopropanol wurde die DNA an die Membran der QIAquick-Silikamembran, die sich in Säulchen befindet, gebunden und mit dem Puffer PE gewaschen. Die DNA wurde in einem Volumen von 30µl eluiert. Die Sequenzierung wurde durch die Firma Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, durchgeführt. In die Sequenzierung wurden N-Gen-PCR-Produkte von ABV aus allen acht ABV-positiven Vögeln einbezogen. Die erhaltenen Sequenzen wurden einer BLAST-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) unterzogen und so einem ABV-Genotyp zugeordnet. Die erhaltenen N-Gensequenzen der Vögel # 7560 und #11851 wurden in der Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) unter den Zugangsnummern HM165233 und HM 165234 abgelegt.

IV. ERGEBNISSE

4.1 Histopathologische Untersuchung

4.1.1 Zentrales Nervensystem (ZNS)

Mononukleäre Infiltrate stellen im ZNS für eine PDD charakteristische Veränderungen dar. Sie kommen häufig perivaskulär vor und werden dann als „perivascular cuffing“ (perivaskuläre Manschetten) bezeichnet. Ausgeprägte perivaskuläre, lymphoplasmazytäre Infiltrate fanden sich bei den Vögeln #11851 und #11361 an zahlreichen Stellen im Großhirn (Abb.1), und etwas weniger stark ausgeprägt, bei Vogel #113. Bei Vogel #9264 kamen zelluläre Infiltrationen vor, die überwiegend aus Gliazellen bestanden. Derartige Gliazellproliferationen fanden sich auch bei #7560 und #7611. Zusätzlich wurden weitere Veränderungen in Form von vakuolärer Neuronendegeneration bei Graupapagei #7560, sowie Synzytiumbildung der Ependymzellen und Dilatation einiger Virchow-Robinscher Räume bei Vogel #14400 festgestellt.

4.1.2 Magen-Darm-Trakt und Nebenniere

Im Magen-Darm-Trakt gelten lymphoplasmazytäre Infiltrate in Ganglien und Nervenzelldegenerationen als charakteristisch für PDD. Typischerweise findet man mononukleäre Zellinfiltrate besonders im Auerbachplexus (Plexus myentericus). Markante lymphoplasmazytäre Infiltrate in zahlreichen Nervenplexen in Kropf, Drüsenmagen, Muskelmagen sowie vereinzelt im Darm zeigte Vogel #11851. Bei #11361 stellte sich ebenfalls eine Ganglionitis non-purulenta in Muskelmagen und Duodenum dar. Dieser Vogel wies auch erhebliche lymphozytäre Infiltrationen im Gebiet der Medullazellen der Nebennieren auf (Abb.1). Solche Infiltrationen in die Nebennieren waren auch bei #14400 zu sehen, wobei hier zusätzlich das Ganglion der Nebenniere betroffen war. Der Graupapagei #7560 zeigte lymphoplasmazytäre Infiltrate und Gliazellproliferation einiger Nervenplexen im Muskelmagen, während sich bei #7611 lediglich Gliazellproliferationen in Ganglien des Kropfes und des Muskelmagens und bei #9264 zusätzlich auch im Muskelmagen darstellen ließen.

Die histologischen Befunde von #14400, #7856 und dem Kontrollvogel #12046 waren negativ für PDD. Der juvenile Kontrollvogel war an den Folgen einer Kropfstase gestorben.

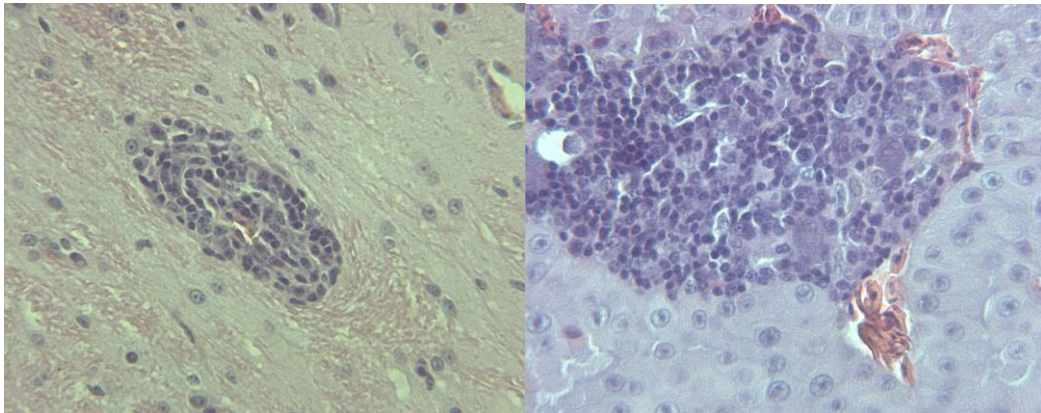


Abbildung 1. Gehirn (links, 25x) und Nebenniere (rechts, 25x) von Vogel #11361. In beiden Organen sind lymphoplasmazytäre Infiltrate dargestellt.

4.2 Immunhistochemische Färbung der Gewebe- und Organproben

Bei der immunhistochemischen Färbung wurden die ABV-Proteine bei Verwendung des Anti-ABV-N-Antikörpers je nach Detektorenzym und -substrat als intensiv braune (Abb.2) oder rote Markierung (Abb.4) der Zellen, und zwar primär der Zellkerne, aber auch des Zytoplasmas, dargestellt. Sowohl die Kontrollreaktionen mit Präimmunserum (Abb.2) als auch Gewebeschnitte des nicht mit ABV infizierten Kontrollvogels #12538 wiesen lediglich die blaue Gegenfärbung des Hämalauns auf, was die Spezifität der in der Immunhistochemie verwendeten Reagenzien, vor allem des Anti-ABV-N-Antikörpers, anzeigt.

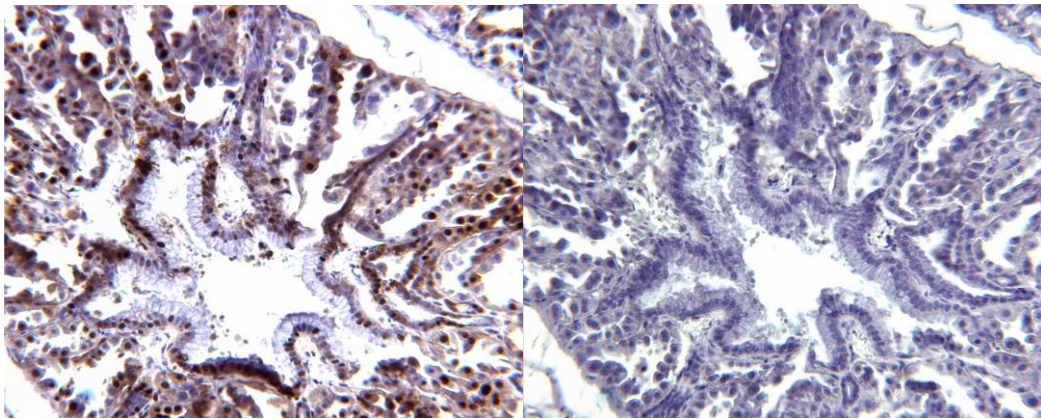


Abbildung 2. Drüsenmagen des Vogels #7560. Links spezifische Antigenfärbung der Drüsenzellen in braun zu sehen. Rechts negativer Kontrollschnitt mit Präimmunserum.

4.2.1 Zentrales Nervensystem und Auge

Bei allen untersuchten Vögeln – außer dem Negativkontroll-Vogel- wiesen die histologischen Schnitte des ZNS eine eindeutige und zum Teil massive Färbung neuronaler Gewebe auf. Betroffen waren neben Neuronen auch Gliazellen, wobei meistens sowohl das Plasma und die Axone als auch die Zellkerne gefärbt waren (Abb.3). Bei den Vögeln #7560, #11851 und #113, bei denen Rückenmark zur Verfügung stand, war dieses in annähernd gleicher Stärke betroffen. Im Kleinhirn dagegen ergab sich ein sehr variables Bild: eine massive Färbung der Grauen Substanz inklusive der Purkinjezellen zeigte sich bei #7856 (Abb.3) und #113; in schwächerer Ausprägung bei #11851, während bei #7611 sowohl die Molekularschicht als auch die Körnerzellschicht unzählige gefärbte Zellen enthielten, aber die Purkinjezellen ungefärbt blieben. Bei #9264, #7560 und #11361 wurde in den Purkinjezellen ebenfalls kein Antigen nachgewiesen bei in unterschiedlicher Ausprägung gefärbter Körnerzellschicht. Der Vogel #14400 zeigt keine spezifische Färbung im Kleinhirn, Sehnerv oder Auge. Sehnerv und Auge blieben auch bei den Vögeln #11851 und #11361 ungefärbt. Bei den restlichen Vögeln (#7560, #7856, #7611, #9264, #113) wurde ABV-Antigen im Ziliarkörper und in der pars optica retinae nachgewiesen. Am Ziliarkörper waren durchweg die inneren, nicht-pigmentierten Zellen des Epithels gefärbt (Abb.4). Die Retina dagegen zeigte in unterschiedlich starker Ausprägung einzelne gefärbte Zellen in der Ganglienzellschicht, der äußeren und inneren Körnerzellschicht und in der Photorezeptorschicht (Abb.4). Weiterhin wurde ABV-Antigen bei Vogel #113 in Zellen des Pecten oculi festgestellt.

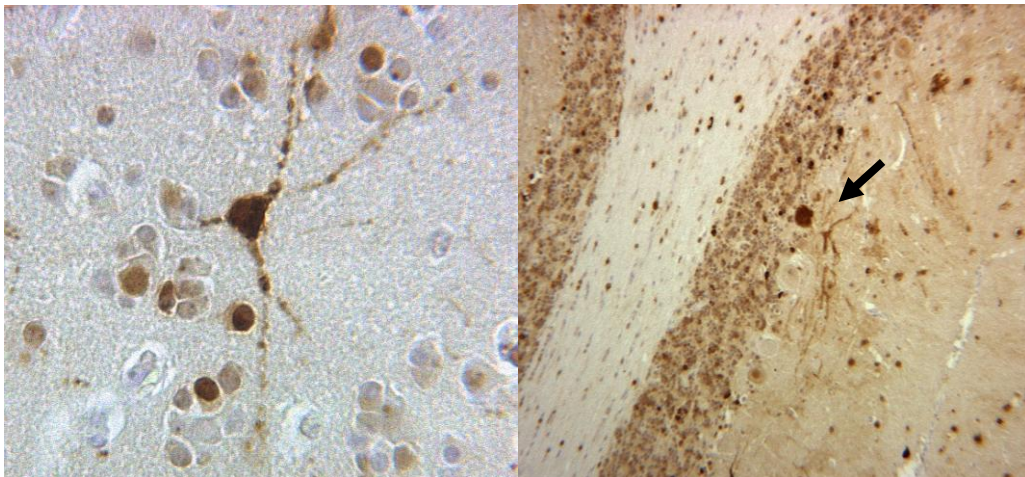


Abbildung 3. Großhirn (links, 40x) und Kleinhirn (rechts, 10x) von Vogel # 7856. Neuron und Gliazellen im Gehirn positiv gefärbt. Kleinhirn in allen Schichten positiv. Pfeil zeigt gefärbte Purkinjezelle.

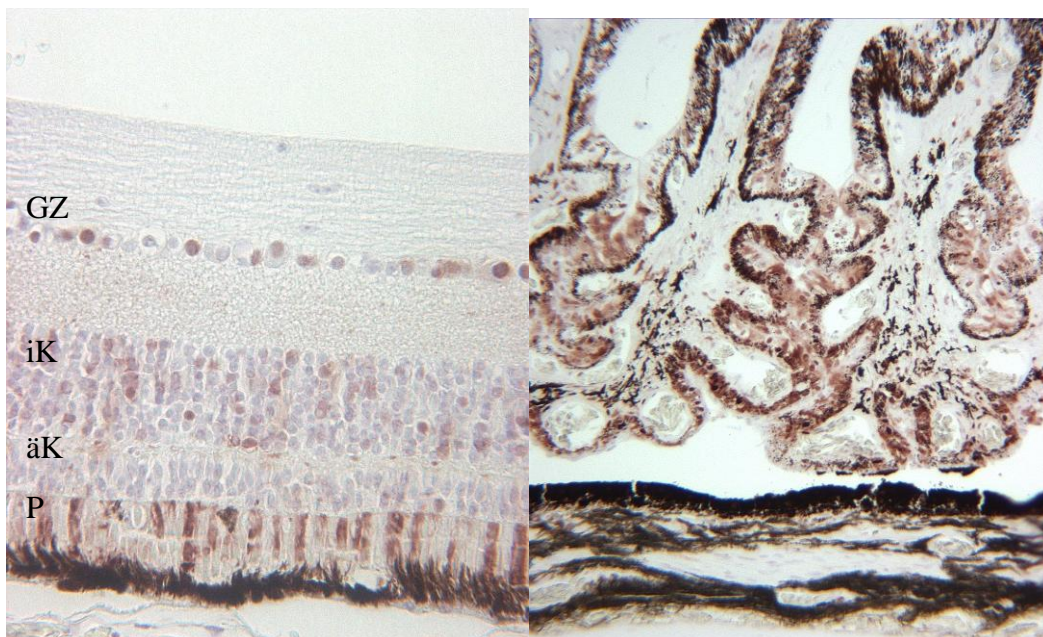


Abbildung 4. Retina (links, 25x) und Ziliarkörper (rechts, 10x) von Vogel #113. Die rötliche Färbung stellt die spezifische Anfärbung des Antigens dar; deutlich zu unterscheiden von dem dunkelbraunem körpereigenen Melanin. Zellkerne der Ganglienzellschicht (GZ), der inneren (iK) und äußeren (äK) Körnerschicht sowie der Photorezeptorschicht (P) sind gefärbt. Im Ziliarkörper ist das Antigen durchgehend im Epithel zu erkennen.

4.2.2 Verdauungstrakt mit Anhangsdrüsen

Histologisch besteht die Wand des Verdauungstraktes aus mehreren Schichten, und zwar von innen nach außen aus der Tunica mucosa, der Tela submucosa, der

Tunica muscularis und der Tunica serosa. In allen Schichten wurde ABV-N-Antigen nachgewiesen. In der Regel handelte es sich um eine Kernfärbung; zusätzlich wurde aber auch häufig das Zytoplasma gefärbt. Im Kropf waren bei den Vögeln #7560 und #7856 Epithelzellen und bei #113 Blutgefäße und Muskelzellen positiv. Die Vögel #11851 und #11361 zeigten dagegen keine spezifische Färbung im Kropf. Im Drüsenmagen (Abb2.) war das Antigen entweder hauptsächlich in den Drüsenzellen (zu sehen bei #7560 und #113) zu finden oder aber auf die Ganglien des Plexus myentericus begrenzt (#11851, #14400, #7611). Beide Teile gleichermaßen betroffen waren bei #7856 und #9264. Im Muskelmagen zeigte sich regelmäßig eine Antigenverteilung in allen Wandschichten (# 7560, 7856, #113, #7611, #9264). Lediglich bei #11851 war die Färbung fast ausschließlich auf die Ganglien begrenzt (Abb.5). Bei den Vögeln #14400 und #11361 war im Muskelmagen und bei #14400 und #11851 im Darm kein Antigen nachweisbar. Im Duodenum, aus dem die meisten Darmproben stammten, waren konstant, aber in unterschiedlich starker Ausprägung sowohl die Schleimhaut mit ihren Enterozyten (#113) als auch die Muskelzellen der Tunica muscularis und die Ganglien (#7560, #7856, #7611, #9264) angefärbt. #11361 zeigte eine sporadische Färbung von Ganglienzellen, ohne dass andere Darmschichten betroffen waren. Bei Vogel #7560 stand außerdem eine Probe des Enddarms zur Verfügung. Hier wiesen die Enterozyten ebenfalls eine ausgeprägte Färbung auf (Abb.5). Der Magen-Darm-Trakt als wichtiges potentiell Virus-Ausscheidungsorgan wies also in allen Teilen- von Kropf bis zum Enddarm- Virusantigen auf.

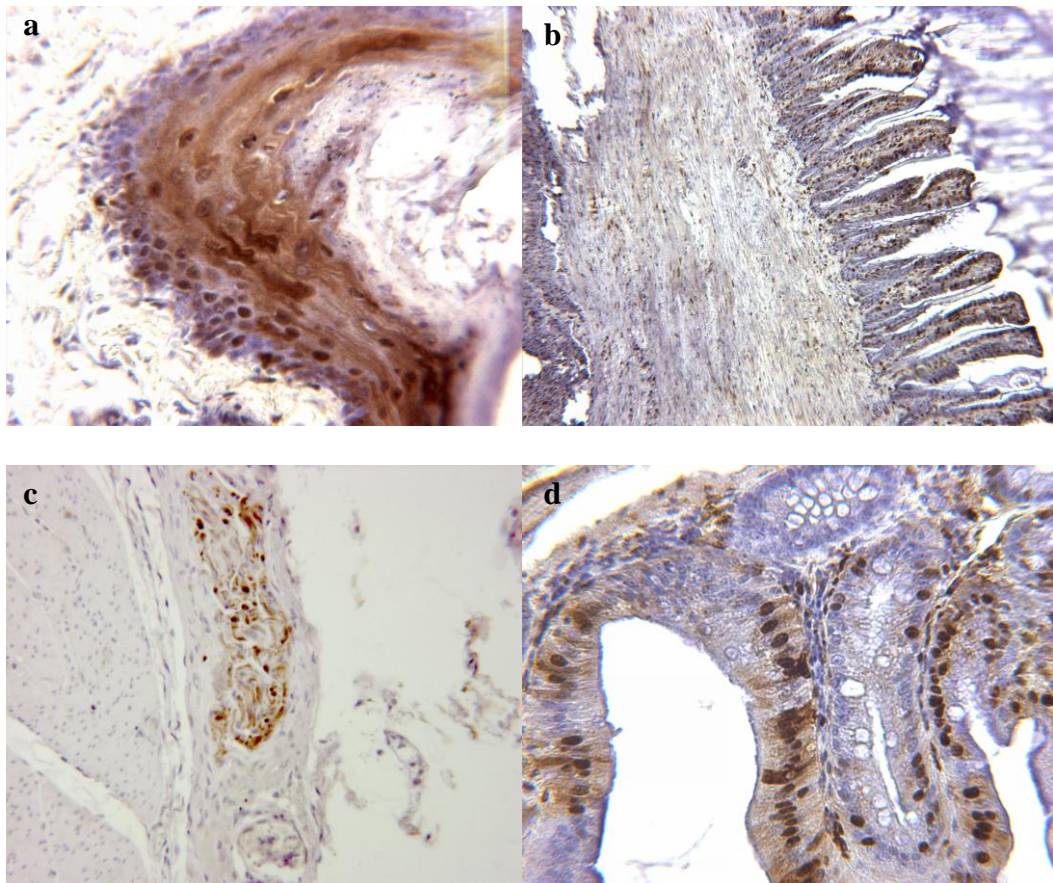


Abbildung 5. Kropf (a, 40x), Muskelmagen (b, 10x) und Enddarm (d, 40x) von Vogel #7560. Muskelmagen (c, 10x) von Vogel #11851. Im Kropf (a) ist eine spezifische Färbung im gesamten Epithel zu sehen. Im Muskelmagen (b) ist besonders das Epithel, aber auch die Muskulatur positiv gefärbt. Antigen-spezifische Braunfärbung ist in diesem Muskelmagen (c) auf subseröse Ganglienzellen beschränkt. Im Enddarm (d) zeigen sich zahlreiche Enterozyten in Kern und Plasma positiv gefärbt.

Die Leber zeigte eine homogene Kernfärbung der Hepatozyten und der Gallengangsepithelien (#7560, #113, #7856, #7611, #9264). Die Bauchspeicheldrüse besteht aus exokrinen Zellarealen mit Ausführungsgängen und Inselzellen, die endokrine Funktionen haben. In der immunhistochemischen Färbung hoben sich die beiden Zelltypen deutlich voneinander ab, da sich die exokrinen Zellen nur im Kern anfärbten, während die Inselzellen auch ein braunes Zytoplasma aufwiesen (#7560, #113, #9264). Bei #7856 konnten keine Inselzellen abgegrenzt werden, die exokrinen Zellen mitsamt Ausführungsgängen reagierten aber positiv (Abb.6). Bei den Vögeln #11361, #11851 und #14400 waren in Leber und Bauchspeicheldrüse keine N-Antigen-spezifischen Reaktionen erkennbar; bei #7611 war keine spezifische Färbung des Pankreas zu sehen.

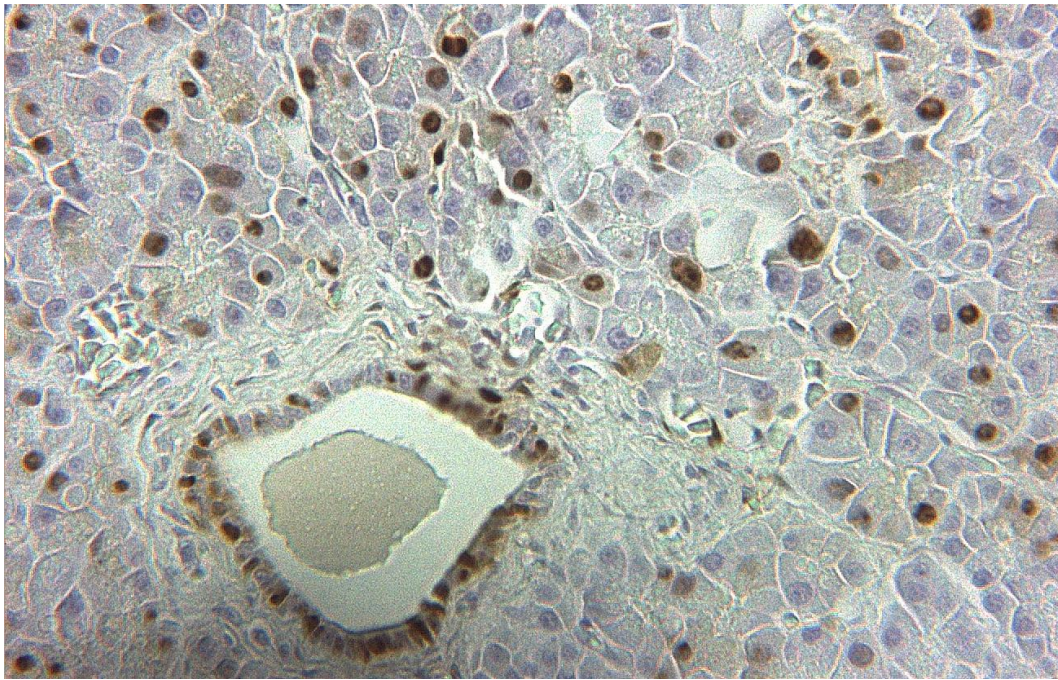


Abbildung 6. Pankreas (25x) von Vogel #7856. Sowohl exokrine Zellen als auch das Epithel des Ausführungsganges sind positiv.

4.2.3 Endokrine Organe und Gonaden

Die Schilddrüse besteht aus Follikeln, in deren Innerem das Thyreoglobulin in Form eines Kolloids gespeichert wird. Die Vögel #113 und #7611 zeigten eine Färbung sowohl des Follikelepithels (Abb.7) als auch des Kolloids (#113). Bei Vogel #9264 wurde mittels Immunhistochemie eine schwache Färbung der Schilddrüse nachgewiesen, während die histologischen Schnitte der restlichen Vögel (#7560, #11851, #7856, #14400 und #11361) keine spezifische Färbung erkennen ließen (Abb.7).

In der Nebenniere können zwei Zelltypen unterschieden werden: die Medullazellen und die Corticalzellen. Beide Zelltypen waren bei #7560 und #113 jeweils in etwa gleicher Ausprägung gefärbt. Bei #11361 zeigten nur die Medullazellen einen nachweisbaren Gehalt an ABV-N-Protein. Bei den Vögeln #11851 und #7586 wurden dagegen keine für N-Protein spezifischen Reaktionen in der Nebenniere nachgewiesen.

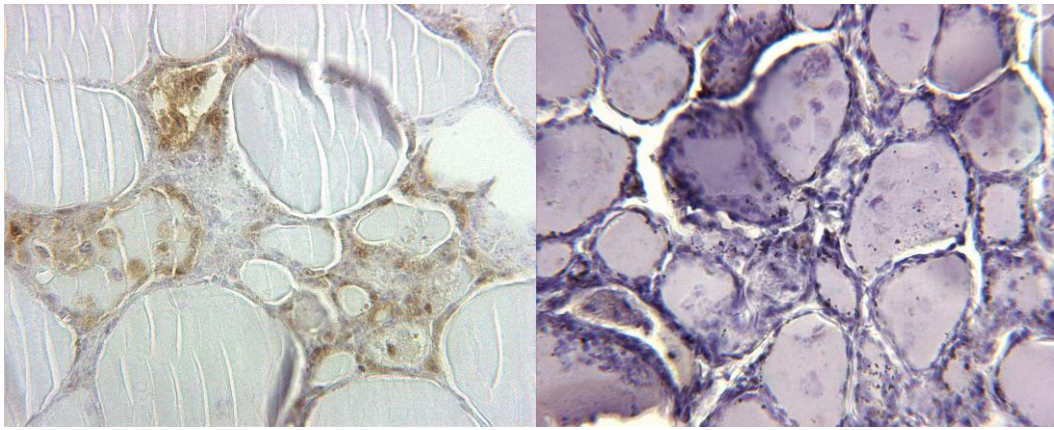


Abbildung 7. Schilddrüse (links, 25x) von Vogel #7611 und Vogel #7560 (rechts, 25x). Links sind deutlich die braunen Follikelepithelzellen zu erkennen, während die rechte Schilddrüse keine spezifische Antigenfärbung zeigt.

Im Hoden wurden Zellen des Keimdrüsenepithels gefärbt, und zwar bei den Vögeln #11851, #7611 und #9264. Allerdings war es nicht möglich, diese genauer als Sertolizellen oder Spermatogonien zu identifizieren, da beide Zelltypen sich in der immunhistochemischen Färbung nicht voneinander abgrenzen ließen (Abb.8a). Auch im Ovar wurde ABV-N-Antigen nachgewiesen. Neben den Theka- und Granulosazellen war auch der Liquor folliculi spezifisch gefärbt (erkennbar bei den Vögeln #7856 und #113). Besonders die Primärfollikel zeigten dabei eine intensive Färbung (Abb.8b). Zudem war bei Vogel #113 ein Abschnitt des Oviduktes in allen Gewebeschichten positiv gefärbt (Abb.8c). Bei den Vögeln #14400 (männlich) und #11361 (weiblich), konnte kein ABV-Antigen in den Gonaden nachgewiesen werden (Abb.8d).

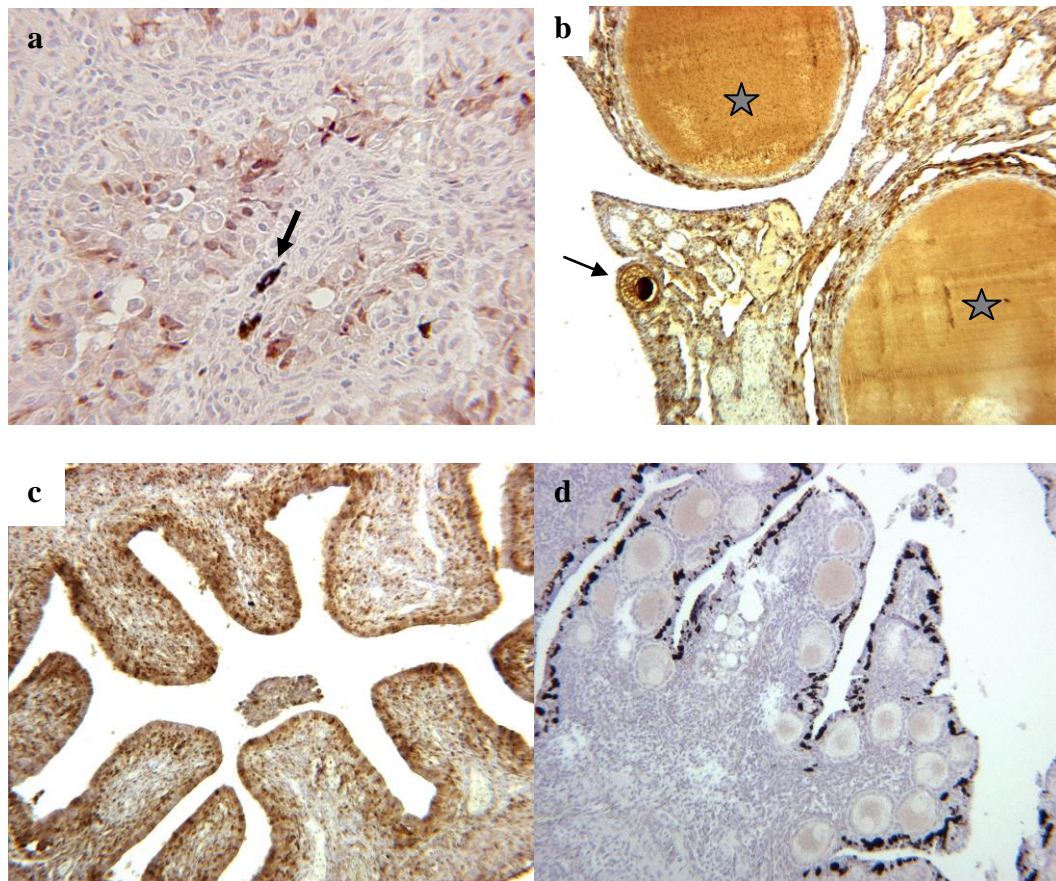


Abbildung 8. a) Hoden (25x) von Vogel #11851. b) Ovar (10x) und c) Ovidukt (10x) von Vogel #113. Ovar (10x) von Vogel #11361. Rötliche ABV-N-Färbung zahlreicher Zellen des Keimepithels im Hoden, die eindeutig von den physiologisch dunkelbraunen melaninhaltigen Zellen (Pfeil) des Kakaduhodens zu unterscheiden sind (a). In Ovar (b) und Ovidukt (c) sind alle Zellentypen spezifisch gefärbt. Dargestellt sind sowohl reifere Follikel (Sternchen) als auch Primärfollikel (Pfeil). Das inaktive Ovar (d) zeigt keine spezifische Antigenfärbung.

4.2.4 Weitere Gewebe und Organe

Im Herz wurde bei den Vögeln #7560 und #7856 ABV-N-Protein in den Muskelzellen, und zwar mit intensiver Färbung, festgestellt. Sowohl die Zellkerne als auch ganze Fasern und das reizleitende System, die Purkinjezellen, waren angefärbt. Dabei reagierten die meisten Zellen positiv (Abb.9). Zusätzlich waren auch das Endocard (bei #113) und Blutgefäße (bei #113, #9264 und #7611) deutlich Antigen-positiv. Bei #9264 fiel eine interessante Verteilung der Färbung auf. Diese war nicht, wie bei den anderen Vögeln, diffus im ganzen Schnitt zu erkennen, sondern fokal begrenzt und zum Teil in auffälliger Nachbarschaft zu betroffenen Blutgefäßen. Bei diesem Vogel waren die Purkinjezellen nicht spezifisch angefärbt.

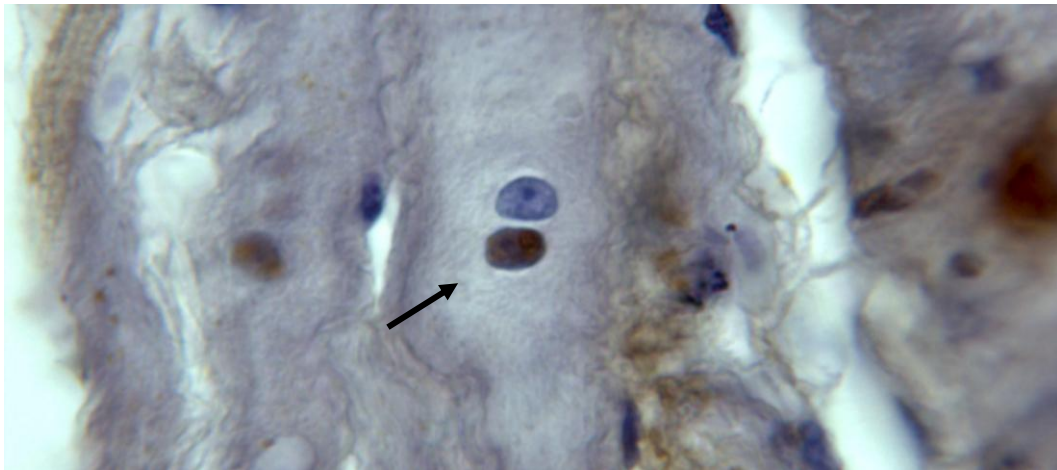


Abbildung 9. Herz (100x) von Vogel #7560. Zu sehen ist ein positiver, braun gefärbter Zellkern einer Purkinjezelle (Pfeil) neben einem ungefärbten Zellkern einer Purkinjezelle.

Die Niere stellte sich bei allen Vögeln relativ einheitlich dar. Die Epithelzellen des tubulären Systems waren durchweg angefärbt (bei den Vögeln #7560, #9264, #7611, #7856 und #113). In den proximalen und distalen Tubuli wurde ABV-Antigen in Kernen und im Zytoplasma nachgewiesen, während in den Sammelrohren und dem Ureter nur die Zellkerne positiv reagierten (Abb.10). Bei den Glomerula ergab sich allerdings ein unterschiedliches Bild. Während bei #7560 und #7856 kein Antigen nachweisbar war, stellte es sich bei #7611, #113 und #9264 dort deutlich dar. Somit war auch die Niere als potentielles Virus-Ausscheidungsorgan, wie auch der Magen-Darm-Trakt, in allen Anteilen betroffen, auch der Ureter als letzter Abschnitt des harnableitenden Systems.

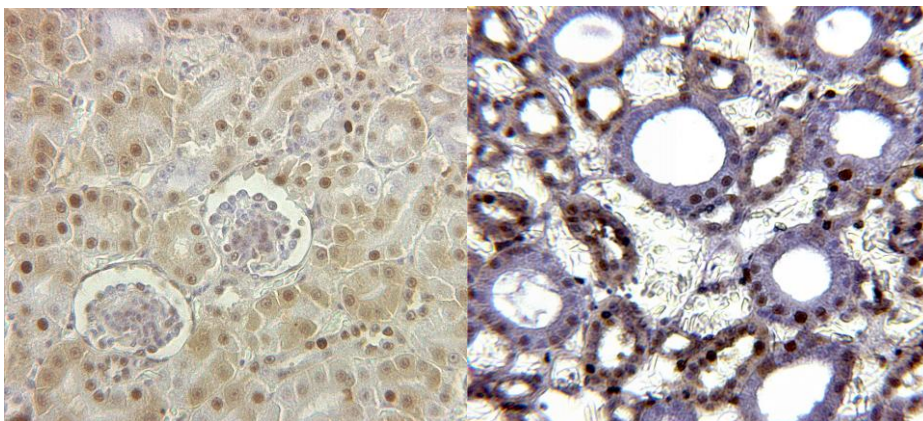


Abbildung 10. Niere (links, 25x) von Vogel #7611 und #7560 (rechts, 25x). Das linke Bild zeigt einen in allen Anteilen positiven Rindenbereich der Niere. Das rechte Bild ist eine Aufnahme des Nierenmarkes mit seinen Sammelrohren, wobei darin nur die Zellkerne gefärbt sind.

Die Lunge enthielt bei den Vögeln #7560, #9264, #7611, #113 und #7856 ABV-Antigen. Dieses wurde vereinzelt in Parenchymzellen festgestellt. Herz, Niere und Lunge zeigten bei den Vögeln #11851, #14400 und #11361 keine Antigen-spezifische Färbung.

In der Milz waren sporadisch einzelne Zellen, möglicherweise Retikulumzellen und Granulozyten, angefärbt (bei #11851, #7856, #113, #7611 und #9264). Der Zelltyp war in der Immunfärbung nicht exakt differenzierbar. Ähnliches trifft auf das Knochenmark zu. Auch hier waren vereinzelt Zellen, möglicherweise Retikulumzellen, positiv gefärbt (#11851, #113, #9264). Bei Vogel #9264 wurde im Knochenmark auch in einer Kapillare ABV-Antigen nachgewiesen. Bei den Vögeln #14400 und #11361 blieb die Milz ungefärbt, bei #7560 und #7856 wurde kein Antigen im Knochenmark festgestellt.

In der Brustmuskulatur war bei den Vögeln #7560, #7856, #113 und #9264 ABV-Antigen in einheitlich schwachem Ausmaß erkennbar. Dabei waren in der Regel die Zellkerne der Muskelzellen, zum Teil aber auch ganze Fasern positiv darstellbar (Abb.11). Bei den Vögeln #7611, #7856 und #9264 waren allerdings primär die die Muskulatur durchziehenden Blutgefäße gefärbt (Abb.11), während die eigentlichen Muskelzellen nur sehr vereinzelt oder gar nicht Antigen-positiv reagierten (bei #7611).

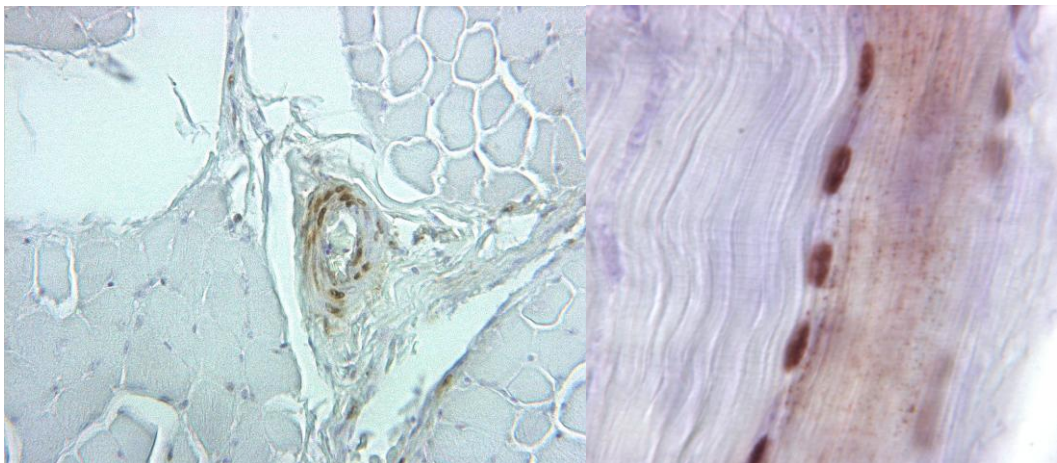


Abbildung 11. Muskulatur von Vogel #7611 (links, 10x) und #7560 (rechts, 100x). Glatte Muskelzellen des Blutgefäßes von Vogel #7611 sind positiv gefärbt. Die umgebenden, quergestreiften Muskelzellen dagegen weisen keine spezifische Färbung auf. Im rechten Bild ist eine quergestreifte Muskelfaser positiv gefärbt.

In der Haut wurde eine intensive Färbung des Epithels, der Federpulpa, des Federscheidenepithels (Abb.12) und des mit den Federn assoziierten Musculus

pennales beobachtet (#7856, #9264, #113). Bei Vogel #7560 wurde ABV-Antigen nur im Federscheiden- und Federpulpaepithel sowie im dazugehörigen glatten Muskel nachgewiesen. Bei #14400 und #7611 wurde eine weniger intensive Färbung festgestellt, die auf das Federscheidenepithel bzw. die Federpulpa begrenzt war. Bei den Vögeln #7856, #9264, #113, #14400 und #7611 wurde ABV-Antigen damit in Bereichen der Haut und Federn dargestellt, die mit dem Ausfall der Federn oder dem Abrieb von Hautpartikeln in die Umgebung gelangen können.

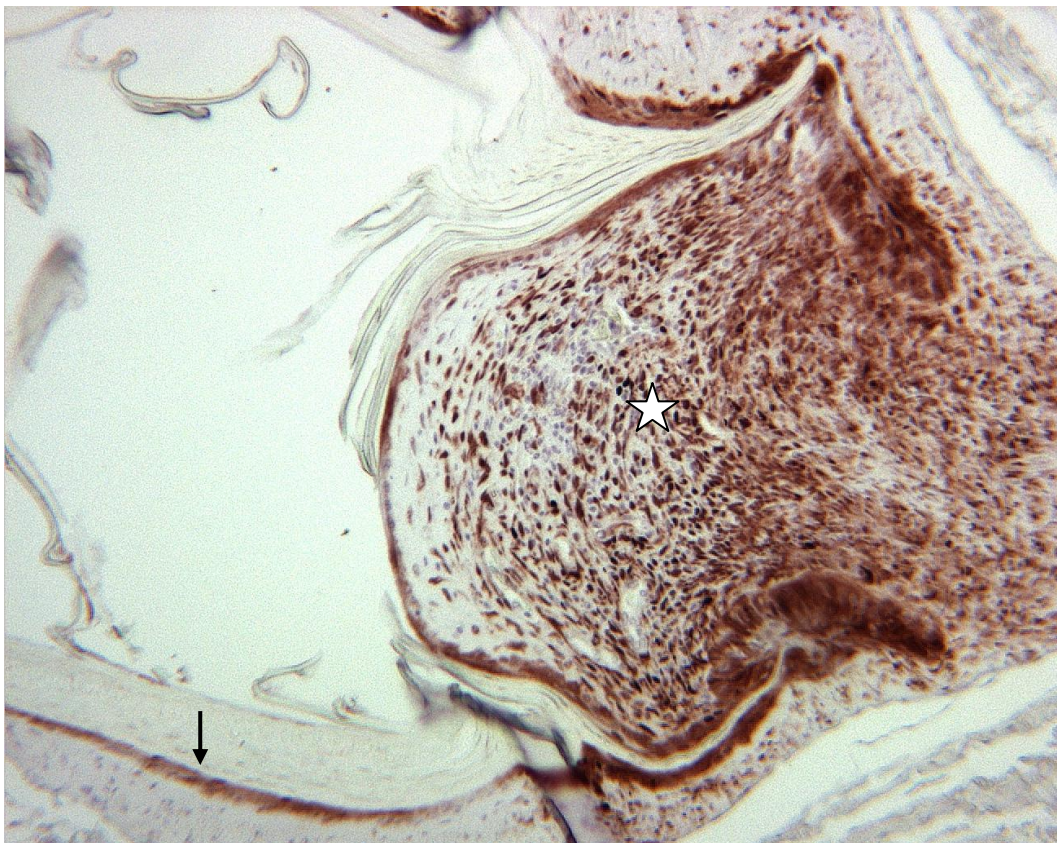


Abbildung 12. Federanschnitt von Vogel #113 (10x). Sowohl die Federpulpa (Sternchen) mit ihrem umgebenden Federpulpaepithel als auch das Federscheidenepithel (Pfeil) sind spezifisch für ABV-N angefärbt.

In Knorpelproben wurde ABV-N-Antigen in keinem Fall nachgewiesen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass bei vier der acht untersuchten Papageien, und zwar bei den Vögeln #7560, #113, #9264 und #7856, ABV-N-Antigen in nahezu allen Geweben und Organen in intensiver Färbung nachgewiesen wurde. Bei zwei Papageien (#11851, #7611) zeigte sich durchaus auch eine breite Gewebeverteilung des Antigens, aber nicht in dem Ausmaß und der Intensität der vorher genannten Papageien. Weitere zwei Papageien (#14400,

#11361) waren eindeutig positiv im Gehirnschnitt, aber kaum ein anderes Organ enthielt ABV-N-Antigen. Bei #14400 waren neben dem Gehirn noch der Drüsenmagen und Federanschnitte positiv; bei #11361 waren zusätzlich zum Großhirn auch Zellen des Kleinhirns, ein Ganglion im Duodenum und die Nebenniere positiv für ABV-N-Antigen (Tabelle 1).

Weiterhin lässt sich festhalten, dass die Virus- ausscheidungsfähigen Organe Auge, Kropf, Darm, Niere, Gonaden, Haut/Feder bei den Vögeln #7560, #7856, #113, #9264 und #7611 zum Teil sehr intensiv gefärbt waren.

Tabelle 1. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von Organen der einbezogenen Papageienvögel

	#7560	#7856	#113	#9264	#7611	#11851	#11361	#14400
Gehirn	+++	++	+++	++	++	+++	++	++
Rückenmark	+++	n.d.	++	n.d.	n.d.	++	n.d.	n.d.
Kleinhirn	+	+++	+++	+	+++	++	+	-
Sehnerv	++	++	+	+	+	-	-	-
Auge	++	++	++	+++	++	-	-	-
Kropf	+++	+	+	n.d.	n.d.	-	-	n.d.
Drüsenmagen	+++	++	+++	++	+	+	-	+
Muskelmagen	+++	++	+++	++	+	++	-	-
Duodenum	+++	+	+++	++	+	-	+	-
Lunge	+	+	+	+	+	-	-	-
Leber	+++	++	+++	+++	++	-	-	-
Pankreas	+++	++	++	++	-	-	-	-
Milz	n.d.	+	++	+	+	+	-	-
Herz	+++	+++	++	+	++	-	-	-
Niere	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
Nebenniere	+++	-	++	n.d.	n.d.	-	+	n.d.
Schilddrüse	-	-	+++	+	+++	-	-	-
Knochenmark	-	-	++	+	n.d.	+	n.d.	n.d.
Gefäßwände	+	++	++	+++	-	-	-	-
Gonaden	n.d.	++	+++	++	+	+	-	-
Muskel	+	+	+	+	-	-	n.d.	-
Haut/Feder	++	+++	+++	+++	(+)	n.d.	n.d.	+
Knorpel	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 1. +++ ein oder mehrere Zelltypen massiv betroffen. ++ ein Zelltyp zum überwiegenden Teil oder zwei Zelltypen zum Teil betroffen. + ein Zelltyp wenig bis vereinzelt betroffen. – negativ. **n.d.** nicht durchgeführt.

4.3. Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Genotypisierung

Von den Vögeln #7560, #11851 und #14400 wurde eine möglichst breite Auswahl an Organ- und Gewebeproben mittels RT-Realtime PCR untersucht und anhand der Ct-Werte ausgewertet. Eine Übersicht über die Ergebnisse ist in Tabelle 2 dargestellt.

Vogel #7560. ABV-RNA wurde bei diesem Vogel in allen 19 untersuchten Organen und Geweben nachgewiesen. Dabei wurden besonders niedrige Ct-Werte (< 20), die einen hohen ABV-RNA-Gehalt anzeigen, im Gehirn, Knochenmark und Hoden festgestellt. Der Großteil der Organe (14/19) zeigte Ct-Werte von 20-24. Lediglich in der Muskulatur und im Nervus ischiadicus wurden mit Ct-Werten von über 25 bzw. über 30 weniger amplifizierbare RNA-Moleküle detektiert.

Vogel #11851. Es standen elf Organe zur Verfügung, die alle in der RT-Realtime PCR bezüglich ABV-RNA positiv reagierten. Das Gehirn wies dabei den mit Abstand niedrigsten Ct-Wert von 20,82 auf, gefolgt von Milz, Ösophagus und Kropf mit Ct-Werten zwischen 25 und 30. Die restlichen Organe (6/11) zeigten Ct-Werte > 30 .

Vogel #14400. Von den elf untersuchten Organen blieb bei diesem Vogel die Leber als einziges Organ negativ für ABV-RNA. Im Großhirn wurde die höchste Viruslast mit einem Ct-Wert von etwas über 20 festgestellt. Mit deutlichem Abstand folgen dann das Kleinhirn, der Muskelmagen und die Lunge mit Ct-Werten zwischen 25 und 30. Die restlichen Organe (8/11) wiesen hohe Ct-Werte > 30 auf.

Tabelle 2. Ergebnisse der RT-Realtime PCR unterschiedlicher Organe der Vögel #7560, #11851 und #14400 (Anmerkung: es sind jeweils die exakten Ct-Werte angegeben, es ist allerdings nur eine semiquantitative vergleichende Bewertung möglich; n.d. = nicht durchgeführt)

Organe	Ct-Werte 7560	Ct-Werte 11851	Ct-Werte 14400
Gehirn	19,48	20,82	21,25
Kleinhirn	n.d.	n.d.	27,20
N. ischiadicus	31,54	n.d.	n.d.
Oesophagus	21,29	28,98	n.d.
Kropf	21,47	28,62	30,88
Drüsenmagen	22,66	33,04	35,94
Muskelmagen	21,95	27,39	27,45
Duodenum	21,06	37,88	31,75*
Jejunum	23,62	n.d.	n.d.
Enddarm	21,04	n.d.	n.d.
Pankreas	20,46	n.d.	31,75*
Leber	20,31	37,92	-
Herz	22,85	38,33	34,53
Milz	n.d.	27,69	n.d.
Trachea	n.d.	n.d.	39,64
Lunge	23,33	36,64	27,74
Niere	22,07	41,61	39,24
Nebenniere	23,98	n.d.	n.d.
Knochenmark	18,92	n.d.	n.d.
Bursa	21,37	n.d.	n.d.
Hoden	19,55	n.d.	n.d.
Muskel	26,62	n.d.	32,27
Haut/Feder	n.d.	n.d.	32,68

* Pankreas und Duodenum von Vogel 14400 wurden als Pool untersucht

Insgesamt lässt sich also festhalten, dass ABV-RNA bei Vogel #7560 in allen Organen mit zum Teil sehr hoher Menge nachgewiesen wurde. Die Vögel #11851 und #14400 zeigten dagegen in ihren Organen insgesamt höhere Ct-Werte. Das heißt, in den Organen waren geringere Mengen an Virus-RNA zu finden. Bei Vogel #14400 lagen die Ct-Werte in acht von 11 Organen über 30 und ein Organ-

die Leber- blieb negativ. Bei Vogel #11851 waren alle Organe positiv und bei sechs von 11 Organen lagen die Ct-Werte über 30.

Deutlich zu erkennen ist, dass RNA in allen Organen zu finden war, die möglicherweise zur Virusausscheidung beitragen. Sowohl die Speiseröhre, Kropf und verschiedene Darmabschnitte bis zum Enddarm, als auch Niere, Lunge, Trachea, Hoden und Haut/Feder enthielten ABV-RNA.

Bei Vergleich der Ergebnisse der Immunhistochemie mit der RT-Realtime PCR ergab sich für Vogel #7560 eine weitestgehende Übereinstimmung. Bei den Vögeln #11851 und #14400 fällt auf, dass auch IHC-negative Organe in der PCR positive Ergebnisse lieferten. Diese Organe erreichten aber Ct-Werte über 25, meistens sogar über 30.

Tabelle 3. Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der IHC und der RT-Realtime PCR

	#7560		#11851		#14400	
	IHC ^a	PCR ^b	IHC ^a	PCR ^b	IHC ^a	PCR ^b
Gehirn	+++	++++	+++	+++	++	+++
Kleinhirn	+	n.d.	++	n.d.	-	++
Kropf	+++	+++	-	++	n.d.	+
Drüsenmagen	+++	+++	+	+	+	(+)
Muskelmagen	+++	+++	++	++	-	++
Duodenum	+++	+++	-	(+)	-	+
Lunge	+	+++	-	(+)	-	++
Leber	+++	+++	-	(+)	-	-
Pankreas	+++	+++	-	n.d.	-	+
Milz	n.d.	n.d.	+	++	-	n.d.
Herz	+++	+++	-	(+)	-	+
Niere	+++	+++	-	(+)	-	(+)
Nebenniere	+++	+++	-	n.d.	n.d.	n.d.
Knochenmark	-	++++	+	n.d.	n.d.	n.d.
Gefäßwände	+	n.d.	-	n.d.	-	n.d.
Gonaden	n.d.	++++	+	n.d.	-	n.d.
Muskel	+	++	-	n.d.	-	+
Haut/Feder	++	n.d.	n.d.	n.d.	+	+

^a +++ ein oder mehrere Zelltypen massiv betroffen. ++ ein Zelltyp zum überwiegenden Teil oder zwei Zelltypen zum Teil betroffen. + ein Zelltyp wenig bis vereinzelt betroffen. – negativ. **n.d.** nicht durchgeführt.

^b RT- Realtime PCR: Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Ct-Werte: < 20, +++++; 20< 25, +++; 25< 30, ++; 30< 35, +; > 35, (+)

Genotypisierung. Unter Verwendung der partiellen N-Gensequenzen ergab die NCBI BLAST Suche, dass die gefundenen ABV alle zum Genotyp 4 gehören, wobei keine der Sequenzen untereinander zu 100% übereinstimmte. Das ABV-N-Genfragment von #7560 zeigte 100% Sequenzidentität mit der korrespondierenden ABV-Region gefunden in einem Gelbhaubenkakadu aus Deutschland (GenBank accession number FJ603686) dessen ABV-Stamm dem Genotyp 4 zugeordnet wurde. Die ABV-N-Gensequenz von #11851 zeigte 99% Übereinstimmung mit neun unterschiedlichen ABV-Stämmen, die alle dem Genotyp 4 zugeordnet wurden: ABV wurde in Graupapageien (*Psittacus erithacus*) aus Kanada (GQ496360), der Schweiz (FJ794747) und Israel (FJ002327, FJ002323) sowie in einem Salomonenkakadu (*Cacatua ducorpsii*) aus Israel (FJ002325), in drei Gelbbrustaras (*Ara ararauna*) aus Israel und Österreich (FJ002324, FJ94733, FJ94734) und einem Rotohrara (*Ara rubrogenys*) aus Österreich (FJ94727) gefunden.

V. DISKUSSION

Erst kürzlich wurden aviäre Bornaviren bei Psittaziden erstmals nachgewiesen (Kistler et al., 2008) und sie gelten derzeit als Erreger der PDD (Gancz et al., 2010, Payne et al., 2011). Wie diese Viren von befallenen Vögeln ausgeschieden und übertragen werden, ist derzeit noch weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher bei acht an PDD verstorbenen Tieren mittels Immunhistochemie die Organverteilung von ABV ermittelt. Die Ergebnisse wurden mittels RT-Realtime PCR validiert und insbesondere hinsichtlich einer potentiellen Virusexkretion ausgewertet.

5.1. Interpretation der Ergebnisse von Histologie, PCR und Immunhistochemie

Die Histologie mit Nachweis lymphoplasmazytärer Infiltrate in Ganglien und Nerven der Wand des proximalen Intestinaltraktes wird immer noch als Goldstandard zur Diagnostik der PDD angesehen (Graham, 1991, Gregory et al., 1994, Degernes et al., 1996, Gancz et al., 2010). Bei den hier untersuchten Vögeln wurde die eindeutige Diagnose „PDD“ nur bei den Vögeln #11851 und #11361 gestellt. Mononukleäre Infiltrate per se, also nicht in Verbindung mit den entsprechenden Ganglien oder Nerven, werden lediglich als diagnostisch für eine Virusinfektion im Allgemeinen angesehen, was für Vogel #113 zutraf. Inwieweit Gliazellproliferationen als erstes histopathologisches Zeichen für PDD betrachtet werden können (Prof. Gerlach, persönliche Mitteilung), ist unklar. Bei den Vögeln #7560, #9264 und #7611 konnte PDD nicht sicher ausgeschlossen werden. Bei der histologischen Untersuchung von ausgewählten Gewebeschnitten (Gehirn, Drüsenmagen, Muskelmagen) der Vögel 7856 und 14400 ergaben sich keine Hinweise auf das Vorliegen einer PDD.

Weiterhin fiel auf, dass sich die Virusmenge, die in der RT-Realtime PCR ermittelt worden war, erheblich unterschied. Die hier aufgeführten Ergebnisse der Realtime-PCR können zwar nicht quantitativ ausgewertet werden, da kein Standard mitgeführt worden war. Da allerdings immer in etwa die gleiche Gewebemenge bei der Extraktion eingesetzt wurde und Elutionsvolumina der RNA und die nachfolgenden Protokolle identisch waren, ist eine semiquantitative

Auswertung möglich. Interessanterweise wurde bei Papagei #11851 eine niedrige Viruslast, aber stark ausgeprägte lymphoplasmazytäre Infiltrate festgestellt, während bei dem Vogel #7560 bei hoher viraler Belastung kaum Infiltrate gefunden wurden. Ob es einen inversen Zusammenhang zwischen der Virusmenge und dem Auftreten lymphoplasmazytärer Infiltrate gibt, müssen jedoch weitere Studien unter Einbeziehung zusätzlicher Vögel zeigen. Allerdings zeigte Patient #14400 keine typischen mononukleären Infiltrate bei, abgesehen vom Gehirn, insgesamt recht niedrigen Virusmengen in den untersuchten Organen.

Einfluss auf die Ausprägung der Infiltrate oder die Viruslast besitzen möglicherweise auch andere Faktoren wie die Infektionsdauer und der generelle Immunstatus der Vögel sowie die Papageienspezies, auch wenn dazu bislang kaum Beobachtungen vorliegen. Bei der experimentellen Infektion bereits als ABV-4-Träger identifizierter Nymphensittiche mit dem virulenten ABV-4 Stamm M24 traten ungewöhnlich massive Infiltrate auf (Payne et al., 2011), während der selbe ABV-4 Stamm bei infizierten Felsensittichen zu gleichartigen, aber milder ausgeprägten histopathologischen Veränderungen führte (Gray et al., 2010), daher wurde spekuliert, dass es bei Superinfektionen zur Ausprägung von Hypersensitivitätsreaktionen kommen könnte (Payne et al., 2011). Ebenfalls denkbar ist, dass sich die Vögel in unterschiedlichen Krankheitsstadien befanden und sich deshalb das Immunsystem unterschiedlich präsentierte. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Viruslast, Spezies und Ausmaß der Ausprägung der lymphoplasmazytären Infiltrate abzusichern, sind noch weitere Untersuchungen nötig.

Bei BD in Ratten wurde in der chronischen Krankheitsphase ein Rückgang der Entzündungsreaktion und der lymphoplasmazytären Infiltrate festgestellt (Hatalski et al., 1998). Die genauen Mechanismen dafür sind nicht bekannt, aber es wurde vermutet, dass IFN- γ beteiligt sein könnte, das bei einer Immunreaktion über die Aktivierung einer Mangan-Superoxid-Dismutase vor freien Sauerstoffradikalen schützen könnte (Shankar et al., 1992). Darüber hinaus könnten auch T-Suppressorzellen einen Rückgang der Entzündung herbeiführen (Shankar et al., 1992). Ob der immunologische Rückzug als Zeichen eines Zusammenbruchs der Wirtsabwehr oder als geänderte Strategie zur Vermeidung weiterer Schäden verstanden werden muss, bleibt offen.

Beim Vergleich unterschiedlicher ABV-Isolate ergab sich eine große genetische Heterogenität. So zeigten sich bei Vergleichen partieller Gensequenzen Identitäten zwischen 50% und 90% (Staeheli et al., 2010), die die Untergliederung in unterschiedliche Genotypen zur Folge hatte. Derzeit werden bei ABV aus Psittaziden sechs Genotypen, mit 1-6 durchnummeriert, unterschieden (Weissenböck et al., 2009a, Staeheli et al., 2010). In dieser Untersuchung wurden die ABV aus den Vögeln nach Sequenzanalyse dem Genotyp 4 zugeordnet, wobei die Viren zwar ähnliche, aber nicht identische Sequenzen hatten, was die genetische Variabilität unterstreicht. Interessanterweise ist die genetische Variabilität bei ABV weitaus größer als bei BDV (Staeheli et al., 2010). Dort wurde eine hohe Genomkonservierung mit Nukleotidunterschieden von weniger als 4 % zwischen den Stämmen weltweit beschrieben, mit Ausnahme des Stammes No/98, der sich mit 15 % Sequenzabweichung von den restlichen abgrenzt (Dürwald et al., 2006). Diese hohe Genomkonserviertheit ist für RNA-Viren an sich sehr untypisch, da sie für hohe Mutationsraten bekannt sind. Möglicherweise ist allerdings das genetische Repertoire von BDV noch nicht vollständig bekannt (Staeheli et al., 2010). So wurde spekuliert, dass die bislang bekannten Stämme Virusvarianten reflektieren, die in der Lage sind, Speziesbarrieren zwischen einem insektivoren Reservoir und Schaf oder Pferd zu überwinden. In wildlebenden Insektivoren und anderen natürlichen Wirtsspezies könnten noch unbekannte BDV-Stämme existieren, die nicht auf Nutztiere übertragen werden (Staeheli et al., 2010). Andererseits wurde auch bei anderen RNA-Viren, zum Beispiel bei den Eastern, Western und Venezuelan Equine Encephalomyelitis-Viren die durch Vektoren übertragen wurden oder die Fähigkeit besaßen, ein breites Wirtsspektrum zu infizieren, eine verhältnismäßig hohe Genomkonservierung beobachtet. Es wurde vermutet, dass durch den Selektionsdruck zur Überwindung der Speziesbarriere offenbar die genetische Variabilität eingeschränkt wird (Dürwald et al., 2006).

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Ergebnisse der Immunhistochemie bezüglich der Organverteilung für drei Papageien (#7650, #11851 und #14400) mit RNA-Nachweisen in der RT-Realtime-PCR verglichen (Tabelle 2). Dabei ergab sich, dass bei Organen, die eine intensive Färbung oder positive Reaktion in unterschiedlichen Zelltypen in der Immunhistochemie gezeigt hatten, auch mittels RT-Realtime-PCR Virus-RNA mit niedrigen Ct-Werten, nachgewiesen werden konnte, was einer hohen Menge an Virus-RNA im Ausgangsmaterial entspricht.

Wenn Organe in der RT-PCR getestet wurden, bei denen in der IHC kein Antigennachweis gelang, wurde trotzdem Virus-RNA festgestellt, allerdings mit deutlich höheren Ct-Werten. Daraus kann gefolgert werden, dass die Nachweisgrenze der IHC höher liegt als die der RT-Realtime-PCR, dass sich beide Methoden also in ihrer Sensitivität unterscheiden. Andererseits konnte sowohl in der vorliegenden Studie in der IHC gezeigt werden, dass sich ABV in Blutgefäßwänden befindet als auch aus Blut ABV-RNA mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Lierz et al., 2009, Rinder et al., 2010). Ein Vorkommen ausreichend hoher Menge an RNA in Blut und Blutgefäßen hätte natürlich zur Folge, dass sämtliche Organe in der PCR positiv getestet werden würden.

5.2. Vergleich von ABV und BDV hinsichtlich ihrer Organverteilung

In dieser Arbeit wurde erstmals mittels Immunhistochemie eine extrem breite Gewebeverteilung der aviären Bornaviren dargestellt. Dabei wurde ABV-Antigen erstmals im Pankreas sowohl in Zellen des exokrinen als auch des endokrinen Teils und im Epithel der Ausführungsgänge nachgewiesen. Weiterhin waren Skelettmuskelzellen, das Federscheidenepithel sowie die Federpulpa und Zellen des Keimepithels im Hoden und in den Ovarien betroffen. Im Auge konnten in verschiedenen Schichten der Retina sowie im Epithel des Ziliarkörpers Antigen-positive Zellen dargestellt werden. Immunhistochemische Untersuchungen beschränkten sich bisher entweder auf neuronale Gewebe (Ouyang et al., 2009) oder den Magendarmtrakt und ausgewählte Organe wie Herz, Niere und Leber (Rinder et al., 2009, Weissenböck et al., 2009a, Weissenböck et al., 2009b). Mittels RT-PCR wurde bereits eine breite Gewebeverteilung nachgewiesen (Lierz et al., 2009, Rinder et al., 2009, Kistler et al., 2010). Diese Untersuchungen erlaubten aber keine Rückschlüsse über die genaue Lokalisation der Viren im Gewebe oder die Identifizierung der betroffenen Zelltypen. Mit immunhistochemischen Techniken können jedoch solche Fragestellungen beantwortet werden. In einer aktuellen Untersuchung an 16 Psittaziden wurde bei acht Vögeln sowohl in der PCR als auch in der IHC eine sehr breite Gewebeverteilung dargestellt, unter anderem in Gonaden, Thyroidea, Haut und Auge (Raghav et al., 2010), dabei wurde allerdings nicht beschrieben, in welchen Zelltypen Antigen nachgewiesen wurde. In einer weiteren aktuellen Untersuchung an experimentell infizierten Nymphensittichen wurde erwähnt, dass ABV-P-

Antigen regelmäßig in den lymphoplasmazytären Infiltraten und dort in großen mononuklären Zellen dargestellt werden konnte. Der betroffene Zelltyp wurde allerdings lediglich anhand der Zellmorphologie bestimmt und nicht genauer verifiziert (Payne et al., 2011). In der hier vorgestellten Studie gelang eine Zuordnung von ABV-Antigen zu Zellen der lymphoplasmazytären Infiltrate bei den hier untersuchten Papageien nicht, mit Ausnahme einzelner verdächtiger Zellen. Zum Einen fanden sich lediglich bei den Vögeln #11361, #113 und #11851 entsprechende Infiltrate in vergleichsweise geringem Ausmaß. Zum Anderen ist es in der IHC-Färbung oftmals schwierig, anhand der Zellmorphologie eindeutig Immunzellen von organspezifischen Zellen zu unterscheiden, weshalb weitere Untersuchungen zur Zellbestimmung notwendig sind.

Es ist bekannt, dass sich ABV auch ins Kleinhirn ausbreitet (Ouyang et al., 2009). Bislang wurde das Virus dort allerdings hauptsächlich in der Körnerzellschicht nachgewiesen, aber nicht in den Purkinjezellen selbst. Es wurde jedoch ein Untergang von Purkinjezellen beobachtet, der sich in einer lückenhaften Purkinjezellschicht zeigte (Ouyang et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Infektion der Purkinjezellen dargestellt und deutlich. Die diese Zellen enthaltene Schicht stellte sich morphologisch unverändert dar. Auf welchem Weg das Kleinhirn mit ABV infiziert wird, ist bisher unbekannt. Bei BDV wurde angenommen, dass sowohl die Ganglienzellen der Retina als auch die Purkinjezellen in der Regel nur über retrograde Ausbreitungsrichtung erreicht werden (Gosztonyi, 2008). BDV breitet sich also vom limbischen System aus über den Sehnerv ins Auge, also entgegen der Richtung der Nervenimpulsleitung, die beim Auge von den Axonen der Ganglienzellen der Retina über den Sehnerv, zu dem sie sich vereinigen, bis ins limbische System führt. Ebenso verhält es sich im Kleinhirn. Alle Information der Kleinhirnrinde läuft in den Purkinjezellen zusammen, deren Axone die einzige Verbindung zum Großhirn bilden. Somit werden auch die Purkinjezellkerne von BDV auf retrogradem Weg erreicht. Man könnte auch bei ABV spekulieren, dass sich diese Viren wie BDV sowohl anterograd, also vom Zellkern zur Peripherie, als auch retrograd, vom Axon zum Zellkern hin, bewegen können. Die Mechanismen und Wege der Ausbreitung von ABV im Wirt sind aber noch völlig unbekannt.

Die histologische Untersuchung der Augen ergab keine pathologischen Befunde.

In der IHC allerdings konnte ABV-Antigen sowohl in der Ganglienzellschicht, der inneren und äußeren Körnerzellschicht und der Photorezeptorschicht als auch im Ziliarkörperepithel dargestellt werden. Weiterhin konnten partielle Ablösungen der Retina beobachtet werden, welche aber als Artefakte des Herstellungsprozesses interpretiert werden mussten, da sie in der HE-Färbung nicht aufgetreten waren. Das Symptom Blindheit, das bei BDV-infizierten Säugern diagnostiziert wurde, wurde auch in Einzelfällen bei Vögeln mit PDD beschrieben (Ludwig et al., 1988, Dietzel et al., 2007, Steinmetz et al., 2008). Bei der Untersuchung eines Vogels mit PDD wurden histologisch retinale Degeneration in Form von Photorezeptorverlust, partielle Ablation und milde lymphoplasmazytäre Infiltrationen festgestellt (Steinmetz et al. 2008). Für BDV-infizierte Säuger wurden Veränderungen an der Retina und Choroidea beschrieben. Die Retina verlor um bis zu ein Drittel ihrer Dicke und die laminäre Organisation war in Extremfällen aufgelöst (Kacza et al., 2001, Krey, 2008). Außerdem fiel ein drastischer Neuronenverlust der inneren und äußeren Körnerschicht (Narayan et al., 1983b) und eine reaktive Gliose der Müllerzellen auf, die zudem verdickte Stammfortsätze und veränderte Ionenströme hatten. Der Verlust von Photorezeptorzellen, der mit einer Zerstörung des retinalen Pigmentepithels einherging, wurde als Ursache für die Blindheit angenommen (Kacza et al., 2001, Dietzel et al., 2007). In der Choroidea wiesen die Blutgefäße zudem typische perivaskuläre Infiltrate auf. Immunhistochemisch konnte das BDV-Antigen in der inneren und äußeren Körnerschicht, sowie im Pigmentepithel dargestellt werden (Krey, 2008), zeigte also weitgehend die gleiche Verteilung wie sie in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen wurde. Inwieweit der Visus der in diese Studie einbezogenen Papageien beeinträchtigt war, ist nicht bekannt.

Bei der PDD kommen unterschiedliche Verlaufsformen vor, die durch eine Variabilität der Krankheitserscheinungen und mehr oder weniger starkes Überwiegen intestinaler oder neurologischer Symptome gekennzeichnet sind. Ob diese verschiedenen Verlaufsformen mit einer unterschiedlichen Gewebeverteilung von ABV korreliert, ist bisher unklar. In verschiedenen Arbeiten wurde ABV -Antigen oder RNA in zahlreichen neuronalen und nicht-neuronalen Geweben nachgewiesen. ABV wurden dabei regelmäßig in Teilen des Magen-Darm-Traktes, Lunge, Leber, Milz, Herz, Niere und Nebenniere gefunden

(Lierz et al., 2009, Rinder et al., 2009, Weissenböck et al., 2009a, Weissenböck et al., 2009b, Kistler et al., 2010). Weiterhin wurden aber auch Fälle beschrieben, in denen ABV-Antigen nur oder primär im Gehirn oder beispielsweise nur im Drüsenmagen dargestellt werden konnte (Weissenböck et al., 2009a). Die hier untersuchten acht Papageien zeigten durchweg eine breite Gewebeverteilung ohne dass jedoch der Krankheitsverlauf genauer verfolgt worden war. Sowohl immunhistochemisch als auch in der PCR zeigten sich bei den einzelnen Vögeln Unterschiede in der Intensität und Menge der gefärbten Zellen sowie der Viruslast. Diese Untersuchungen sind allerdings noch nicht ausreichend und bedürfen weiterer Aufarbeitung. BDV verhält sich in seinen Wirten bei natürlicher Infektion streng neurotrop. In der Vergangenheit schlugen Versuche das Virus in anderen Organen oder im Blut nachzuweisen fehl (Heinig, 1969). Bei *in vitro* Tests oder experimentellen Infektionsversuchen mit Labortieren dagegen war es den BDV ebenso möglich nicht-neuronale Gewebe zu infizieren. *In vitro* zeigte sich bei der Kokultivierung von Embryo-Hirnzellen mit Vero- oder MDCK-Zellen ein Übergreifen der Infektion auf die Nierenzellen (Herzog und Rott, 1980). Bei experimentell infizierten Kaninchen konnte BDV in Auge, Pankreas, Nieren, Nebennieren, Ovarien und Blut nachgewiesen werden (Heinig, 1969). Im Rattenmodell wurde BDV weiterhin im enterischen Nervensystem gefunden (Carbone et al., 1987), sowie in Leber, Milz, Niere und Hoden (Heinig, 1969). Eine aktuelle Untersuchung an Spitzmäusen, einer möglichen Reservoirspezies, zeigte ebenfalls eine Virusverteilung in sämtlichen Organen. Unter Anderem waren Haut, Myokard, Leydig Zellen des Hodens, Epidymidis, Penis, Urethra, Uterus und das Bronchiolarepithel betroffen (Puorger et al., 2010).

Möglicherweise ist der Neurotropismus der BDV also abhängig von den Fähigkeiten und dem individuellen Status der jeweiligen Immunsysteme. So verhielt sich BDV nach intrazerebraler Infektion in adulten Ratten neurotrop, während sich bei neonatalen beziehungsweise immuninkompetenten Ratten eine Virusausbreitung auf extra-neuronale Gewebe zeigte (Herzog et al., 1984, Stitz et al., 1991). Möglicherweise haben neutralisierende Antikörper einen Einfluss auf die Gewebeverteilung von BDV. Es wurde zudem beschrieben, dass neutralisierende Antikörper- wenn sie mittels Serumtransfer intravenös injiziert werden- in der frühen Erkrankungsphase der Bornaschen Krankheit eine Virusausbreitung auf nicht-neuronale Gewebe erfolgreich verhindern (Stitz et al.,

1998). Inwiefern neutralisierende Antikörper aber wirklich entscheidend auf die Gewebeverteilung einwirken ist unklar, da sie natürlicherweise erst spät im Krankheitsverlauf auftreten. (Hatalski et al., 1995). Möglicherweise scheint die Speziespezifität erheblichen Einfluss auf die Gewebeverteilung zu haben, da sich BDV in seinem natürlichen Wirt (Pferd, Schaf) neurotrop verhält, aber in verschiedenen Tiermodellen (Ratte, Maus) und möglichen Reservoirspezies auch andere Zelltypen befallen kann (Puorger et al., 2010, Raghav et al., 2010). Ebenfalls eine breite Gewebeverteilung zeigte sich in adulten, immunkompetenten Ratten, die intranasal mit BDV infiziert worden waren. Hierbei wurde RNA in Gesichtshaut, Speicheldrüsen, Herz, Magen, Darm, Skelettmuskel, Nebenniere, Blase und Eierstöcken gefunden (Shankar et al., 1992). Denkbar wäre also auch, dass der Infektionsweg oder der eingesetzte BDV-Stamm die Gewebeverteilung beeinflusst.

5.3. Ausscheidung und Übertragung von ABV und BDV

Für ABV wird bisher eine direkte Übertragung von Vogel zu Vogel auf einem fäkal-oralen Weg angenommen (De Kloet und Dorrestein, 2009, Lierz et al., 2009, Rinder et al., 2009, Kistler et al., 2010, Raghav et al., 2010). Immunhistochemie und PCR-Untersuchungen der hier einbezogenen Papageien stützen den fäkalen Ausscheidungsweg dadurch, dass das Virus im gesamten Magen-Darmtrakt gefunden wurde. Sowohl das Epithel von Kropf und Mägen, als auch die Epithelien von Dünn- und Dickdarm sowie der Kloake zeigten in den immunhistochemischen Tests auf ABV-Antigen eine deutlich positive Färbung. RNA dieser Viren konnte auch mittels RT-PCR in den entsprechenden Organen nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse lassen aber auch eine Spekulation über weitere Ausscheidungswege zu. So scheint eine Virusausscheidung über Vomitus oder Regurgitation durchaus möglich und ABV könnte dabei beispielsweise über abgeschilferte Epithelzellen aus dem proximalen Verdauungstrakt in die Außenwelt gelangen. Bei Vogelspezies, die ihre Jungtiere über regurgitiertes Futter oder Kropfmilch versorgen, wäre eine Übertragung auf diesem Weg denkbar. BDV dagegen wurde in Ratten zwar im enterischen Nervensystem gefunden (Carbone et al., 1987) und dort vor allem in submukösen

Plexus (Pfannkuche et al., 2008), aber die Annahme einer fäkalen Ausscheidung war damit nicht verbunden, da BDV bislang nicht im Kot gefunden wurde (Sauder und Staeheli, 2003).

ABV könnte auch mit dem Urin ausgeschieden werden. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass sich ABV-Antigen in der vorliegenden Untersuchung von den Nierentubuli bis hin zum Ureterepithel darstellen ließ. Eine Ausscheidung mit Urin wird auch bei BDV vermutet, da in einem Anzuchtversuch infektiöses BDV in Urin nachgewiesen werden konnte (Sauder und Staeheli, 2003). Für BDV existieren zudem weitere Hypothesen zur möglichen Virusausscheidung. So zeigten frühe Untersuchungen an experimentell infizierten Kaninchen, dass BDV auch in Speichel, Kammerwasser des Auges, Muttermilch und Nasensekret enthalten war (Heinig, 1969). Bei erkrankten Schafen und Pferden konnte infektiöses Virus in Speichelproben und Tränenflüssigkeit nachgewiesen werden (Vahlenkamp et al., 2002). Nasentupfer von asymptomatischen Schafen und Pferden waren ebenfalls BDV-RNA positiv (Richt et al., 1993, Vahlenkamp et al., 2002). Bei ABV wurden bislang kaum derartige Körpersekrete untersucht. Dabei liegt es nahe, dass ABV beispielsweise auch im Kammerwasser zu finden ist. Das Epithel des Ziliarkörpers ist die Produktionsstätte des Kammerwassers (König und Liebich, 2001) und genau dort wurde ABV-Antigen nachgewiesen.

Weiterhin interessant ist die Tatsache, dass ABV in der vorliegenden Studie im Federscheidenepithel und der Federpulpa nachgewiesen werden konnte. Eine Übertragung durch Federstaub, der infizierte abgeschilferte Epithelzellen enthält, könnte die Folge sein und wurde bereits für andere vogelpathogene Viren beschrieben. Dazu gehört beispielsweise das Mareks disease virus (Purchase, 1976), das chicken anemia virus (Davidson et al., 2008) oder das psittacine circovirus (Niagro et al., 1998). BDV wurde in Spitzmäusen in epidermalen Basalzellen und in Talgdrüsen der Haut entdeckt (Puorger et al., 2010). Es erscheint plausibel, dass auf diesem Weg auch BDV ausgeschieden werden könnte. Ob dies allerdings für die Übertragung eine Rolle spielt, ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Da bei den Säugetieren aber bislang keine Übertragung von systemischen, viralen Erkrankungen über Hautpartikel bekannt ist, könnte die Federstaubübertragung bei ABV einen wesentlichen Unterschied zu BDV darstellen.

Wie ABV von Papageien aufgenommen wird, ist derzeit völlig unklar und es existieren nur Spekulationen über eine mögliche orale Infektion. Für BDV wurde weiterhin eine Virusaufnahme über den Nervus olfactorius favorisiert, weil BDV nach experimenteller Infektion als erstes im Riechkolben (bulbus olfactorius) und dem nucleus olfactorius anterior zu finden war (Morales et al., 1988, Sauder und Staeheli, 2003).

Neben der horizontalen Übertragung kann aber auch eine vertikale Virusweitergabe mit pränataler Virusaufnahme im Ei nicht ausgeschlossen werden. Die vorliegenden Ergebnisse würden eine solche Übertragung von den Elternvögeln über das Ei auf das Küken stützen. In beiden hier einbezogenen Hoden (#9264, #7611) wurde ABV-Antigen im Keimepithel gefunden. Bei zwei weiblichen Vögeln (#7856, #113) waren die Theka- und Granulosazellen der Ovarien sowie der Liquor folliculi massiv betroffen. Für BDV ist eine vertikale Übertragung im Mausmodell untersucht worden. Dabei wurde BDV-RNA sowohl in der Plazenta als auch in den Feten nachgewiesen (Okamoto et al., 2003). Darüberhinaus gibt es auch einen dokumentierten Fall beim Pferd. Bei einer an ZNS-Symptomen erkrankten, tragenden Vollblutstute wurde BDV-RNA im Gehirn der Stute und ihres Fetus nachgewiesen (Hagiwara et al., 2000). Ob ABV über das Ei auf die Nachkommen übertragen werden können oder ob möglicherweise durch eine ABV-Infektion die Funktionalität der befallenen Geschlechtsorgane und damit die Reproduktionstätigkeit beeinträchtigt wird, ist bislang noch nicht untersucht.

Erste Informationen zu möglicher Virusübertragung, Ausbreitung einer ABV-Infektion in einem Bestand und anschließend auftretenden Fällen von PDD bei natürlicher Infektion wurden von Kistler et al. (2010) publiziert. Dabei wurde der Erreger über einen mit ABV infizierten älteren Graupapagei in einen Bestand mit Handaufzucht eingeschleppt. Kontakt mit den Nestlingen bestand nur indirekt und zwar dadurch, dass der an PDD erkrankte Altvogel auf einem Tisch an einer Verletzung behandelt wurde, auf dem anschließend die Jungtiere gefüttert wurden. Der Tisch oder die Hände des Papageienhalters wurden dabei nicht desinfiziert. Elf Jungtiere des Bestandes erkrankten nach einer minimalen Inkubationszeit von etwa 3 Wochen an PDD und zeigten Kopfschütteln, Ataxien und Regurgitation von Futter. Sie starben nach kurzer Krankheitsdauer oder wurden euthanasiert. Zudem wurde ABV-RNA bei 14 von 46 weiteren Jungvögeln, die innerhalb der

Studiendauer überlebten, nachgewiesen. Über drei Papageien-Nestlinge, die sich nur kurzzeitig in diesem Bestand aufgehalten hatten, wurde die Infektion zudem in einen weiteren Aufzuchtbetrieb getragen. Der exakte Weg der Infektionsübertragung wurde nicht ermittelt. Da jedoch in Kloakentupfer von zahlreichen Vögeln ABV-RNA nachgewiesen worden war, wurde eine fäkal-orale Übertragung angenommen (Kistler et al. 2010).

Ein gemeinsames Merkmal der durch Bornaviren verursachten Erkrankungen ist die variable Inkubationszeit, die sowohl für die Bornasche Krankheit als auch für PDD beschrieben wurde. Für die BD wird für Pferde und Schafe ein Zeitraum von wenigen Wochen bis mehrere Monate angegeben (Richt et al., 1989). Im Rattenmodell wurde dargestellt, dass die Inkubationszeit der Zeitspanne entspricht, die BDV braucht, um von der Eintrittspforte in die Zielzellen des Gehirns zu gelangen (Carbone et al., 1987). Auch bei PDD wird eine sehr variable Inkubationszeit angenommen, die unter Anderem möglicherweise auch vom Alter der Vögel beeinflusst wird. Bei Jungtieren wurden schwere Verläufe mit kurzer Inkubationszeit von zwei bis vier Wochen beobachtet (Kistler et al., 2010), während bei adulten Tieren gezeigt wurde, dass sie auch über einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren Virus ausscheiden können ohne zu erkranken (De Kloet und Dorrestein, 2009). Insbesondere bei ABV-Infektionen gilt jedoch, dass es unklar ist, wie sicher eine Infektion insbesondere in frühen Phasen nachzuweisen ist, da dann möglicherweise eine Virusausscheidung sehr gering ist, so dass daher auch die Inkubationszeit nur schwierig zu ermitteln ist.

Strittig war bei BDV lange Zeit, was genau ein infektiöses Virus ausmacht. Da keine infektiösen Viren in den Gehirnen erkrankter Tiere fotografisch dargestellt werden und auch nur wenige Virionen aus dem Überstand BDV-infizierter Zellkulturen isoliert werden konnten (Bajramovic et al., 2003), entstand die Hypothese, dass bereits nicht-behüllte Ribonukleoproteinkomplexe von BDV infektiös sind (Cubitt und de la Torre, 1994). Diese Hypothese wurde aber in Frage gestellt, da neutralisierende Antikörper gegen das G-Protein, ein Hüllprotein, in der Zellkultur erfolgreich die Virusausbreitung verhinderten (Bajramovic et al., 2003). Später wurde bekannt, dass das G-Protein für die Infektiosität der Viruspartikel verantwortlich ist, da es als Oberflächenprotein membranverschmelzende Eigenschaften besitzt und die endozytotische Aufnahme in die Wirtszelle vermittelt (Gonzalez-Dunia et al., 1998, Perez und de la Torre,

2005). Neuere Ergebnisse zeigen außerdem, dass die G-Protein-vermittelte Anlagerung an empfängliche Zellen cholesterolabhängig ist (Clemente et al., 2009). Bislang geht man davon aus, dass sich BDV im Gehirn transsynaptisch ausbreitet. Unerklärt bleibt dabei allerdings, dass man keine Viruspartikel im synaptischen Spalt findet. Möglich wäre ein aktiver Transport von viralen Nukleokapsiden im Gehirn, während in Organen komplette Viren zur Ausbreitung nötig sind (Gosztonyi, 2008). Entsprechende Studien existieren für ABV bisher nicht. Dieses Virus wurde bisher in der Regel in Form von RNA oder über Antigen-Antikörperreaktionen nachgewiesen. Definierte Infektionsversuche mit von Vögeln ausgeschiedenem ABV-RNA-haltigem Material existieren nicht, so dass keine Schlussfolgerungen darüber gezogen werden können, ob dieses Material tatsächlich infektiöses Virus enthält. Im Kammerwasser eines ABV infizierten Edelpapageis konnte elektronenmikroskopisch virusähnliche Partikel mit einer Bornaviren entsprechenden Morphologie nachgewiesen werden (Hoppes et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde ABV- Antigen und -RNA nicht nur im Gastrointestinaltrakt sondern auch in den Gonaden, der Haut und in Federn nachgewiesen, die an einer Virusverbreitung beteiligt sein können. Daher sollten weitere Übertragungswege als die fäko-orale Transmission in Betracht gezogen werden. Eine Virusausscheidung über Federstaub oder eine transovariale Übertragung des Virus ist daher zu vermuten und in zukünftigen Untersuchungen sollte daher geprüft werden, ob infektiöses Virus in diesen Materialien vorhanden ist.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Aviäre Bornaviren wurden im Sommer 2008 erstmals bei Papageienvögeln nachgewiesen. Sie gelten als Erreger der Neuropathischen Drüsenmagendilatation der Psittaziden, die als wichtigste Magen-Darm-Erkrankung der Papageien angesehen wird und durch gastrointestinale Symptome mit Erbrechen, Durchfall und Maldigestion sowie neurologische Ausfallserscheinungen gekennzeichnet ist. Da der Erreger dieser Erkrankung erst seit kurzem bekannt ist, sind grundlegende Kenntnisse zur Epidemiologie und Pathogenese der Erkrankung wie der Erregerübertragung und Organverteilung derzeit noch sehr lückenhaft. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Gewebeverteilung aviärer Bornaviren (ABV) bei natürlich infizierten und erkrankten Papageien mittels Immunhistochemie darzustellen und so mögliche Hinweise auf Ausscheidungsorgane und Übertragungswege zu erhalten.

In die Untersuchungen zur Gewebeverteilung von ABV wurden acht Papageien verschiedener Spezies mit der Verdachtsdiagnose PDD einbezogen. Die Vögel hatten im Vorfeld typische Symptome in Form von Verdauungsstörungen und/oder neurologischen Dysfunktionen gezeigt. Lymphoplasmazytäre Infiltrate in Ganglien und Nerven der Wand des proximalen Intestinaltraktes, charakteristisch für PDD, wurden bei den Vögeln #11851 und #11361 festgestellt. Bei Vogel #113 wurden lediglich mononukleäre Infiltrate als Hinweis auf eine Virusinfektion diagnostiziert. Gliazellproliferationen wurden bei den Vögeln #7560, #9264 und #7611 nachgewiesen, die möglicherweise als erstes Anzeichen einer PDD zu deuten sind. Bei der histologischen Untersuchung von ausgewählten Gewebeschnitten (Gehirn, Drüsenmagen, Muskelmagen) der Vögel #7856 und #14400 ergaben sich keine Hinweise auf das Vorliegen einer PDD.

Die immunhistochemischen Analysen ergaben, dass bei vier der acht untersuchten Papageien (#7560, #113, #9264, #7856) ABV-N-Protein in nahezu allen Geweben und Organen und dabei in vielen Zellen nachweisbar war. Virusantigen wurde unter anderem in unterschiedlichen Zellen des ZNS, in Enterozyten des Magen-Darm-Traktes, in den Nieren und in Epithelien der harnableitenden Wege, in den Gonaden, den Augen sowie in Hautepithelzellen festgestellt. Zwei Papageien (#11851, #7611) zeigten ebenfalls eine breite Gewebeverteilung des Antigens; es

waren aber Zellen in einem geringeren Ausmaß betroffen als bei den vorher genannten Papageien. Bei zwei weiteren Papageien (#14400, #11361) wurde ABV-N-Protein nahezu ausschließlich in Gehirnschnitten nachgewiesen.

Mittels RT-Realtime PCR wurde bei drei ausgewählten Vögeln (#7560, #11851, #14400) ein breites Spektrum an Organen auf das Vorhandensein von ABV-RNA untersucht. Dabei ergab sich, dass ABV-RNA in allen untersuchten Organen, wenn auch oftmals in sehr geringen Mengen, zu finden war. Dies wurde als Hinweis auf eine höhere Sensitivität der PCR im Vergleich zur IHC interpretiert.

Aus Geweben der ABV-positiven Papageien wurden Fragmente des ABV-N-Gens in einer konventionellen RT-PCR amplifiziert und sequenziert. Bei allen Vögeln wurde ABV-4 als beteiligter Genotyp identifiziert. Die beteiligten ABV-Stämme waren in der partiellen N-Gen-Sequenz allerdings nicht identisch.

Bisher wurde für ABV eine direkte Übertragung vor allem auf fäko- oralem Weg angenommen. Der hier erfolgte Nachweis von ABV-Antigen in Enterozyten des Colons stützt diese Vermutung. Darüberhinaus zeigte die hier dargestellte Gewebeverteilung mit Nachweisen in Kropf, Nieren und Epithelien der harnableitenden Wege, Augen, Hautepithelzellen und Gonaden noch weitere Möglichkeiten der Virusausscheidung auf. Da das Kropfepithel ABV-positiv war, wäre es denkbar, dass Virus über Erbrochenes oder regurgitiertes Futter ausgeschieden wird. In der Niere wurde in den Epithelien des gesamten harnbildenden und -ableitenden Apparates, von den Nierentubuli bis zum Harnleiter, ABV-Antigen nachgewiesen, so dass von einer ABV-Ausscheidung auch über den Urin ausgegangen werden muss. Im Auge waren sowohl retinale Zellen als auch das nicht-pigmentierte Epithel des Ziliarkörpers, welcher an der Kammerwasserproduktion beteiligt ist, positiv für ABV. Eine Virusausscheidung über Tränenflüssigkeit ist daher in Betracht zu ziehen. Das Auffinden von ABV im Federscheiden- und Federpulpaepithel rechtfertigt den begründeten Verdacht einer Ausscheidung und Übertragung von ABV über Federstaub. Weiterhin wurde ABV-Antigen im Keimepithel des Hodens sowie in Zellen und Follikeln des Ovars dargestellt, weshalb eine mögliche Virusausscheidung über Sperma beziehungsweise eine Eiübertragung bedacht werden sollte.

VII. SUMMARY

In summer 2008 avian bornavirus has first been described to occur in psittacine birds. These viruses are presumed to be the causative agent of proventricular dilatation disease, which is regarded as the most important gastrointestinal disease of parrots and is characterized by vomitus, diarrhea, malabsorption and neurological disorders. Since the causative agent has been only recently discovered, basic knowledge of epidemiology or pathogenesis of this disease such as viral transmission or tissue distribution is currently incomplete. Thus the aim of this investigation was to reveal the tissue distribution of avian bornaviruses (ABV) in naturally infected and diseased parrots using immunohistochemistry and to achieve information about possible ways of viral excretion.

Eight parrots of different species with the tentative diagnosis of PDD were included. Previously all the birds had shown typical signs of digestive and/or neurological disorders. Histopathologic investigations revealed lymphoplasmacytic infiltrates in ganglia and mural nerves of the proximal intestinal tract, characteristic of PDD, in only two birds, #11851 and #11361. In bird #113 solely mononuclear infiltrates indicative of viral infection were diagnosed. Glial cell proliferations were detected in birds #7560, #9264 and #7611, they might represent a first manifestation of PDD. Histologic examination of selected tissues (brain, proventriculus, ventriculus) of birds #7856 and #14400 did not show any indication for the presence of PDD.

In immunohistochemical analyses ABV-N-Protein was detected in almost every tissue and organ in four out of the eight parrots (#7560, #113, #7856, #9264). In these birds, the protein was found in many different cell types including various cells of CNS, enterocytes of gastrointestinal tract, kidney cells and epithelia of urinary system, gonad, eye and epithelial skin cells. Two further parrots (#11851, #7611) also showed a broad tissue distribution of antigen, but cells were affected to a lesser extent than in the parrots mentioned above. In two other parrots (#14400, #11361) ABV-N-protein was nearly exclusively detected in the CNS.

By means of RT-Realtime PCR a broad spectrum of organs of three selected birds (#7560, #11851, #14400) was examined for the presence of ABV RNA. ABV RNA was located in every organ included in the investigation, although often in

very small quantities. This was interpreted as indication of higher sensitivity of PCR in comparison to IHC.

Using conventional RT-PCR and sequencing, partial ABV-N gene sequences were obtained from viruses of the naturally infected parrots. In all birds ABV-4 was identified as the genotype involved. However, the partial N gene sequences found were not identical to each other.

So far direct transmission of ABV by faecal-oral route is generally assumed. The evidence of ABV antigen in enterocytes of colon presented here supports this assumption. However, the broad tissue distribution of ABV with evidence of antigen in crop, kidney and epithelia of urinary system, eyes, epithelial skin cells and gonad would also suggest other possibilities of viral excretion. As the crop epithelium was positive for ABV protein, virus might also be excreted via vomitus or regurgitated feed. In the kidney, ABV antigen was detected in epithelia of the urinary producing and excretion system extending from the tubuli to the ureter so that ABV excretion via urine has to be assumed, too. In the eye, retinal cells as well as the non-pigmented epithelium of the ciliary body, which contributes to the production of aqueous fluid, were positive for ABV. Viral excretion via lacrimal fluid therefore might be considered. Localisation of ABV in the feather pulp and feather sheath epithelium suggests excretion and transmission of ABV via feather powder. Moreover, ABV antigen was present in the germinal epithelium of testicles as well as in cells and follicles of the ovary. Therefore a possible virus excretion via sperm or transmission via eggs should be taken in consideration.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

AKAIKE, T., WEIHE, E., SCHAEFER, M., FU, Z. F., ZHENG, Y. M., VOGEL, W., SCHMIDT, H., KOPROWSKI, H. & DIETZSCHOLD, B. (1995) Effect of neurotropic virus infection on neuronal and inducible nitric oxide synthase activity in rat brain. *Journal of Neurovirology*, 1, 118-25.

ANTINOFF, N. (2001) It isn't always PDD: three cases with proventricular enlargement. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, 35-37

ASHASH, E., MALKINSON, M., MEIR, R., PERL, S. & WEISMAN, Y. (1996) Causes of losses including a Borna disease paralytic syndrome affecting young ostriches of one breeding organization over a five-year period (1989-1993). *Avian Dis*, 40, 240-5.

BAJRAMOVIC, J. J., MUNTER, S., SYAN, S., NEHRBASS, U., BRAHIC, M. & GONZALEZ-DUNIA, D. (2003) Borna disease virus glycoprotein is required for viral dissemination in neurons. *Journal of Virology*, 77, 12222-31.

BERHANE, Y., SMITH, D. A., NEWMAN, S., TAYLOR, M., NAGY, E., BINNINGTON, B. & HUNTER, B. (2001) Peripheral neuritis in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Avian Pathol*, 30, 563-70.

BOND, M. W., DOWNS, D. & WOLF, S. (1993) Screening for psittacine proventricular dilatation syndrome. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, 92- 97

BOURTEELE, S., OESTERLE, K., PLESCHKA, S., UNTERSTAB, G., EHRHARDT, C., WOLFF, T., LUDWIG, S. & PLANZ, O. (2005) Constitutive activation of the transcription factor NF-kappaB results in impaired borna disease virus replication. *Journal of Virology*, 79, 6043-51.

BRIESE, T., DE LA TORRE, J. C., LEWIS, A., LUDWIG, H. & LIPKIN, W. I.

(1992) Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89, 11486-9.

BRIESE, T., SCHNEEMANN, A., LEWIS, A. J., PARK, Y. S., KIM, S., LUDWIG, H. & LIPKIN, W. I. (1994) Genomic organization of Borna disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 4362-6.

BUSCHE, R., FRESE, K. & WEINGARTEN, M. (1985) Zur Pathologie des macaw wasting syndrome. Symposium über die Erkrankungen der Zootiere, Torino. 325- 329

CARBONE, K. M., DUCHALA, C. S., GRIFFIN, J. W., KINCAID, A. L. & NARAYAN, O. (1987) Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *Journal of Virology*, 61, 3431-40.

CAZAYOUX VICE, C. A. (1992) Myocarditis as a component of psittacine proventricular dilatation syndrome in a Patagonian conure. *Avian Diseases*, 36, 1117-1119.

CLARK, F. D. (1984) Proventricular dilatation syndrome in large psittacine birds. *Avian Diseases*, 28, 813- 815.

CLEMENTE, R., DE PARSEVAL, A., PEREZ, M. & DE LA TORRE, J. C. (2009) Borna disease virus requires cholesterol in both cellular membrane and viral envelope for efficient cell entry. *Journal of Virology*, 83, 2655-62.

CUBITT, B. & DE LA TORRE, J. C. (1994) Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *Journal of Virology*, 68, 1371-81.

DAHLHAUSEN, B., ALDRED, S. & COLAIZZI, E. (2002) Resolution of

clinical proventricular dilatation disease by cyclooxygenase 2 inhibition. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, 9-12

DANNER, K. & MAYR, A. (1979) In vitro studies on Borna virus. II. Properties of the virus. *Archives of Virology*, 61, 261-71.

DAOUST, P. Y., JULIAN, R. J., YASON, C. V. & ARTSOB, H. (1991) Proventricular impaction associated with nonsuppurative encephalomyelitis and ganglioneuritis in two Canada geese. *Journal of Wildlife Diseases*, 27, 513-7.

DAVIDSON, I., ARTZI, N., SHKODA, I., LUBLIN, A., LOEB, E. & SCHAT, K. A. (2008) The contribution of feathers in the spread of chicken anemia virus. *Virus Res*, 132, 152-9.

DE FRANCISCO, N., RUIZ TROYA, J. D. & AGUERA, E. I. (2003) Lead and lead toxicity in domestic and free living birds. *Avian Pathology*, 32, 3-13.

DE KLOET, S. R. & DORRESTEIN, G. M. (2009) Presence of avian bornavirus RNA and anti-avian bornavirus antibodies in apparently healthy macaws. *Avian Dis*, 53, 568 - 573.

DEB, A., BORJAL, R. J., BÜRKLE, M., WATSON, R. & HAMMER, S. (2008) Evaluation of avian paramyxovirus-1 serology and crop biopsy for the diagnosis of proventricular dilatation disease in captive spix's macaws (*Cyanopsitta spixii*). Proceedings of the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians, Leipzig, Germany. 239 - 242

DEGERNES, L. A. & FLAMMER, K. (1991) proventricular dilatation syndrome in green-winged macaw. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, 45- 49

DEGERNES, L. A., LOVE, E. N. & LAUGHERY, M. C. (1996) Review of

radiographic changes associated with proventricular dilatation disease. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, 209-211

DIETZEL, J., KUHRT, H., STAHL, T., KACZA, J., SEEGER, J., WEBER, M., UHLIG, A., REICHENBACH, A., GROSCHE, A. & PANNICKE, T. (2007) Morphometric analysis of the retina from horses infected with the Borna disease virus. *Veterinary Pathology*, 44, 57-63.

DIETZSCHOLD, B., SCHWAEBLE, W., SCHAFER, M. K., HOOPER, D. C., ZEHNG, Y. M., PETRY, F., SHENG, H., FINK, T., LOOS, M., KOPROWSKI, H. & WEIHE, E. (1995) Expression of C1q, a subcomponent of the rat complement system, is dramatically enhanced in brains of rats with either Borna disease or experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Neurological Science*, 130, 11-6.

DONELEY, R. J., MILLER, R. I. & FANNING, T. E. (2007) Proventricular dilatation disease: an emerging exotic disease of parrots in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 85, 119-23.

DOOLEN, M. (1994) Crop biopsy- a low risk diagnosis for neuropathic gastric dilatation. Proc Annu Conf Assoc Avian Vet, Orlando, Florida. 193- 196

DÜRRWALD, R., KOLODZIEJEK, J., MULUNEH, A., HERZOG, S. & NOWOTNY, N. (2006) Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host populations. *Microbes and Infection*, 8, 917-29.

ENGELHARDT, K. R., RICHTER, K., BAUR, K., STAEHELI, P. & HAUSMANN, J. (2005) The functional avidity of virus-specific CD8⁺ T cells is down-modulated in Borna disease virus-induced immunopathology of the central nervous system. *European Journal of Immunology*, 35, 487-97.

FURRER, E., BILZER, T., STITZ, L. & PLANZ, O. (2001) Neutralizing antibodies in persistent borna disease virus infection: prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis. *Journal of Virology*, 75, 943-51.

GANCZ, A. Y., CLUBB, S. & SHIVAPRASAD, H. L. (2010) Advanced diagnostic approaches and current management of proventricular dilatation disease. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 13, 471 - 494.

GANCZ, A. Y., KISTLER, A. L., CLUBB, S., SKEWES-COX, P., FISCHER, K., SORBER, K., CHIU, C. Y., LUBLIN, A., MECHANI, S., FARNOUSHI, Y., GRENINGER, A., WEN, C. C., KARLENE, S. B., GANEM, D. & DERISI, J. L. (2009a) Divergent Borna viruses are associated with proventricular dilatation disease. Proceedings EAAV, Antwerpen. 147-154

GANCZ, A. Y., KISTLER, A. L., GRENINGER, A. L., FARNOUSHI, Y., MECHANI, S., PERL, S., BERKOWITZ, A., PEREZ, N., CLUBB, S., DERISI, J. L., GANEM, D. & LUBLIN, A. (2009b) Experimental induction of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) inoculated with brain homogenates containing avian bornavirus 4. *Virology Journal*, 6, 100.

GERLACH, H. (1984) Update of the macaw wasting syndrome. 4. *Arbeitstagung der Zootierärzte*. Münster.

GERLACH, S. (1991) Update of the macaw wasting syndrome. Proceedings European Chapter, Association of Avian Veterinarians, Utrecht, Netherlands. 273-281

GONZALEZ-DUNIA, D., CUBITT, B. & DE LA TORRE, J. C. (1998) Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *Journal of Virology*, 72, 783-8.

GOSZTONYI, G. (2008) Natural and experimental Borna disease virus infections--neuropathology and pathogenetic considerations. *APMIS Supplement*,

124, 53-7.

GOUGH, R. E., DRURY, S. E., CULVER, F., BRITTON, P. & CAVANAGH, D. (2006) Isolation of a coronavirus from a green-cheeked Amazon parrot (*Amazon viridigenalis* Cassin). *Avian Pathology*, 35, 122-6.

GRAHAM, D. L. (1984) Infiltrative splanchnic neuropathy - a component of the "wasting macaw" complex? Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, 275

GRAHAM, D. L. (1991) "Wasting/Proventricular dilatation disease" a pathologist view. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, 43- 44

GRAY, P., HOPPE, S., SUCHODOLSKI, P., MIRHOSSEINI, N., PAYNE, S., VILLANUEVA, I., SHIVAPRASAD, H. L., HONKAVUORI, K. S., BRIESE, T., REDDY, S. M. & TIZARD, I. (2010) Use of avian bornavirus isolates to induce proventricular dilatation disease in conures. *Emerg Infect Dis*, 16, 473-9.

GREGORY, C. R., LATIMER, K. S., CAMPAGNOLI, R. P. & RITCHIE, B. W. (1996) Histologic evaluation of the crop for diagnosis of proventricular dilatation syndrome in psittacine birds. *J Vet Diagn Invest*, 8, 76-80.

GREGORY, C. R., LATIMER, K. S., NIAGRO, F. D., RITCHIE, B. W., CAMPAGNOLI, R., NORTON, T. M., MCMANAMON, R. M. & GREENACRE, B. (1994) Review of proventricular dilatation syndrome. *J Avian Med Surg*, 8, 69- 75.

GREGORY, C. R., LATIMER, K. S., NIAGRO, F. D., ROBERTS, A. W., CAMPAGNOLI, R., PESTI, D., RITCHIE, B. W. & LUKERT, P. D. (1997a) Investigations of eastern equine encephalomyelitis virus as the causative agent of psittacine proventricular dilatation syndrome. *Journal of avian medicine and surgery*, 11, 187- 193.

GREGORY, C. R., RITCHIE, B. W., KENNETH, S. L., STEFFENS, W. L., CAMPAGNOLI, R. P., PESTI, D. & LUCKERT, P. D. (1998) Experimental transmission of psittacine proventricular dilatation disease (PDD) and preliminary characterization of a virus recovered from birds with naturally occurring and experimentally induced PDD. Proceedings 1th International Virtual Conference of Veterinary Medicine: Diseases of Psittacine Birds, Athens, USA.

GREGORY, C. R., RITCHIE, B. W., LATIMER, K. S., STEFFENS, W. L., CAMPAGNOLI, R., PESTI, D. & LUKERT, P. D. (1997b) proventricular dilatation disease: a viral epornitic. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, Bedford, Texas, USA. 43- 52

GREGORY, C. R., RITCHIE, B. W., LATIMER, K. S., STEFFENS, W. L., PESTI, D., CAMPAGNOLI, R. & LUKERT, P. D. (2000) Progress in understanding proventricular dilatation disease. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, Weatherford, Texas, USA. 269-275

GRIMM, F., KÖSTERS, J. & NUR MOHAMED, F. (1993) Zur Diagnose der neuropathischen Magendilatation der Psittaziden. Verh Erkr Zootiere. 313 - 316

GRUND, C. H., GRIMM, F. & KÖSTERS, J. (1999) Serological studies on persistent aPMV-1 infection associated with PDD. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, 19- 23

GRUND, C. H., MOHN, U. & KORBEL, R. (2005) Relevance of low virulent avian paramyxovirus serotype 1 for psittacine birds. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, 283-286

GRUND, C. H. & RITTER, H. (2004) Retrospektive feingewebliche Untersuchung von Psittaziden mit der Verdachtsdiagnose neuropathische Magendilatation. 14. Tagung über Vogelkrankheiten, München, Deutschland. 147 - 153

GRUND, C. H., WERNER, O., GELDERBLOM, H. R., GRIMM, F. &

KOSTERS, J. (2002) Avian paramyxovirus serotype 1 isolates from the spinal cord of parrots display a very low virulence. *Journal of Veterinary Medicine, Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 49, 445-51.

HAGIWARA, K., KAMITANI, W., TAKAMURA, S., TANIYAMA, H., NAKAYA, T., TANAKA, H., KIRISAWA, R., IWAI, H. & IKUTA, K. (2000) Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. *Vet Microbiol*, 72, 207-16.

HATALSKI, C. G., HICKEY, W. F. & LIPKIN, W. I. (1998) Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus. *Journal of Neuroimmunology*, 90, 137-42.

HATALSKI, C. G., KLICHE, S., STITZ, L. & LIPKIN, W. I. (1995) Neutralizing antibodies in Borna disease virus-infected rats. *Journal of Virology*, 69, 741-7.

HAUSMANN, J., HALLENSLEBEN, W., DE LA TORRE, J. C., PAGENSTECHER, A., ZIMMERMANN, C., PIRCHER, H. & STAEHELI, P. (1999) T cell ignorance in mice to Borna disease virus can be overcome by peripheral expression of the viral nucleoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 9769-74.

HAUSMANN, J., SAUDER, C., WASMER, M., LU, B. & STAEHELI, P. (2004) Neurological disorder after Borna disease virus infection in the absence of either interferon-gamma, Fas, inducible NO synthase, or chemokine receptor CXCR3. *Viral Immunology*, 17, 79-85.

HEINIG, A. (1969) Die Bornasche Krankheit bei Pferden und Schafen. In: Handbuch der Virusinfektionen. Ed RÖHRER, H., Bd. 4, pp 83-148

HELDSTAB, A., MORGENSTERN, R., RÜEDI, D., ALBEK, A. & ALBEK, M. (1985) Pathologie einer endemieartigen Neuritis im Magen-/Darmbereich bei Großpapageien (wasting macaw complex, infiltrative splanchnic neuropathy). Symposium über Erkrankungen der Zootiere, Torino. 317- 324

HERZOG, S., ENDERLEIN, D., HEFFELS-REDMANN, U., PIEPENBRING, A., NEUMANN, D., KALETA, E. F., MÜLLER, H., LIERZ, M. & HERDEN, C. (2010) Indirect immunofluorescence assay for intra vitam diagnostic of avian bornavirus infection in psittacine birds. *Journal of Clinical Microbiology*.

HERZOG, S., KOMPTER, C., FRESE, K. & ROTT, R. (1984) Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution. *Medical Microbiology and Immunology*, 173, 171-7.

HERZOG, S. & ROTT, R. (1980) Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Medical Microbiology and Immunology*, 168, 153-8.

HILBE, M., HERRSCHE, R., KOLODZIEJEK, J., NOWOTNY, N., ZLINSZKY, K. & EHRENSPERGER, F. (2006) Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 675-7.

HONKAVUORI, K. S., SHIVAPRASAD, H. L., WILLIAMS, B. L., QUAN, P. L., HORNIG, M., STREET, C., PALACIOS, G., HUTCHISON, S. K., FRANCA, M., EGHOLM, M., BRIESE, T. & LIPKIN, W. I. (2008) Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1883-6.

HOOPER, D. C., KEAN, R. B., SCOTT, G. S., SPITSIN, S. V., MIKHEEVA, T., MORIMOTO, K., BETTE, M., ROHRENBECK, A. M., DIETZSCHOLD, B. & WEIHE, E. (2001) The central nervous system inflammatory response to neurotropic virus infection is peroxynitrite dependent. *Journal of Immunology*, 167, 3470-7.

HOPPE, S., GRAY, P. L., PAYNE, S., SHIVAPRASAD, H. L. & TIZARD, I. (2010) The isolation, pathogenesis, diagnosis, transmission, and control of avian Bornavirus and proventricular dilatation disease. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 13, 495 - 508.

HORNIG, M., BRIESE, T. & LIPKIN, W. I. (2003) Borna disease virus. *Journal*

For Neurovirology, 9, 259-73.

HUGHES, P. E. (1984) The pathology of myenteric ganglioneuritis, psittacine encephalomyelitis, proventricular dilatation of psittacines, and macaw wasting disease. Proceedings Western Poultry Disease Conference, Davis, Californien. 85-87

JOYNER, K. L., KOCK, N. & STYLES, D. (1989) Encephalitis, proventricular and ventricular myositis, and myenteric ganglioneuritis in an umbrella cockatoo. *Avian Diseases*, 33, 379-81.

KACZA, J., MOHR, C., PANNICKE, T., KUHRT, H., DIETZEL, J., FLUSS, M., RICHT, J. A., VAHLENKAMP, T. W., STAHL, T., REICHENBACH, A. & SEEGER, J. (2001) Changes of the organotypic retinal organization in Borna virus-infected Lewis rats. *Journal of Neurocytology*, 30, 801-20.

KAIDA, K. & KUSUNOKI, S. (2010) Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barre syndrome and Fisher syndrome: mini-review. *J Neuroimmunol*, 223, 5-12.

KISTLER, A. L., GANCZ, A., CLUBB, S., SKEWES-COX, P., FISCHER, K., SORBER, K., CHIU, C. Y., LUBLIN, A., MECHANI, S., FARNOUSHI, Y., GRENINGER, A., WEN, C. C., KARLENE, S. B., GANEM, D. & DERISI, J. L. (2008) Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virology*, 5, 88.

KISTLER, A. L., SMITH, J. M., GRENINGER, A., DERISI, J. L. & GANEM, D. (2010) Analysis of naturally occurring avian bornavirus infection and transmission during an outbreak of proventricular dilatation disease among captive psittacine birds. *J virol*, 2176- 2179.

KOBAYASHI, T., SHOYA, Y., KODA, T., TAKASHIMA, I., LAI, P. K., IKUTA, K., KAKINUMA, M. & KISHI, M. (1998) Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus

nucleoprotein. *Virology*, 243, 188-97.

KOHNO, T., GOTO, T., TAKASAKI, T., MORITA, C., NAKAYA, T., IKUTA, K., KURANE, I., SANO, K. & NAKAI, M. (1999) Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *Journal of Virology*, 73, 760-6.

KOŁODZIEJEK, J., DURRWALD, R., HERZOG, S., EHRENSPERGER, F., LUSSY, H. & NOWOTNY, N. (2005) Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *Journal of General Virology*, 86, 385-98.

KÖNIG, H. E. & LIEBICH, H. G. (2001) Anatomie und Propädeutik des Geflügels. Schattauer Verlag, pp 195 - 214

KRAUS, I., EICKMANN, M., KIERMAYER, S., SCHEFFCZIK, H., FLUESS, M., RICHT, J. A. & GARTEN, W. (2001) Open reading frame III of borna disease virus encodes a nonglycosylated matrix protein. *Journal of Virology*, 75, 12098-104.

KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. E. & FRESE, K. (1987) Die neurogene Drüsenmagendilatation der Psittaziden "Macaw wasting disease". *Der praktische Tierarzt*, 10, 72- 76.

KREY, H. (2008) Ocular involvement in BDV-infected rabbits and primates. *APMIS Supplementum*, 124, 58-60.

LANG, G. (2006) Histotechnik: Praxislehrbuch für biomedizinische Analytik. Springer Verlag, pp 258-292

LIERZ, M., HAFEZ, H. M., HONKAVUORI, K. S., GRUBER, A. D., OLIAS, P., ABDELWHAB, E. M., KOHLS, A., LIPKIN, W. I., BRIESE, T. & HAUCK, R. (2009) Anatomical distribution of avian bornavirus in parrots, its occurrence in clinically healthy birds and ABV-antibody detection. *Avian Pathol*, 38, 491-6.

LUBLIN, A., MECHANI, S., FARNOUSHI, I., PERL, S. & BENDHEIM, U. (2006) An outbreak of proventricular dilatation disease in psittacine breeding farm in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 61, 16-18.

LUDWIG, H., BODE, L. & GOSZTONYI, G. (1988) Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Progress in Medical Virology*, 35, 107-51.

MALKINSON, M., WEISMAN, Y., ASHASH, E., BODE, L. & LUDWIG, H. (1993) Borna disease in ostriches. *Veterinary Record*, 133, 304.

MANNL, A., GERLACH, H. & LEIPOLD, R. (1987) Neuropathic gastric dilatation in psittaciformes. *Avian Dis*, 31, 214-21.

MORALES, J. A., HERZOG, S., KOMPTER, C., FRESE, K. & ROTT, R. (1988) Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Medical Microbiology and Immunology*, 177, 51-68.

MORI, I., NISHIYAMA, Y., YOKOCHI, T. & KIMURA, Y. (2005) Olfactory transmission of neurotropic viruses. *Journal For Neurovirology*, 11, 129-37.

NARAYAN, O., HERZOG, S., FRESE, K., SCHEEFERS, H. & ROTT, R. (1983a) Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. *Science*, 220, 1401-3.

NARAYAN, O., HERZOG, S., FRESE, K., SCHEEFERS, H. & ROTT, R. (1983b) Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *Journal of Infectious Diseases*, 148, 305-15.

NIAGRO, F. D., FORSTHOEFEL, A. N., LAWTHORP, R. P., KAMALANATHAN, L., RITCHIE, B. W., LATIMER, K. S. & LUKERT, P. D.

(1998) Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch Virol*, 143, 1723-44.

NOWOTNY, N., KOLODZIEJEK, J., JEHLE, C. O., SUCHY, A., STAEHEL, P. & SCHWEMMLE, M. (2000) Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *Journal of Virology*, 74, 5655-8.

OGAWA, H., SANADA, Y., SANADA, N., KUDO, M., TUCHIYA, K., KODAMA, T. & UETSUKA, K. (2011) Proventricular Dilatation Disease Associated with Avian Bornavirus Infection in a Citron-Crested Cockatoo that Was Born and Hand-Reared in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2011, 28.

OKAMOTO, M., HAGIWARA, K., KAMITANI, W., SAKO, T., HIRAYAMA, K., KIRISAWA, R., TSUJI, M., ISHIHARA, C., IWAI, H., KOBAYASHI, T., TOMONAGA, K., IKUTA, K. & TANIYAMA, H. (2003) Experimental vertical transmission of Borna disease virus in the mouse. *Arch Virol*, 148, 1557-68.

OROSZ, S. E. & DAHLHAUSEN, R. D. (2007) Proventricular dilatation syndrome in an amazon parrot: possible role of PCR diagnostics of paramyxovirus-1 for presumptive diagnosis. Proceedings, 9th EAAV Conference, Zürich, Schweiz. 27 - 28

OUYANG, N., STORTS, R., TIAN, Y., WIGLE, W., VILLANUEVA, I., MIRHOSSEINI, N., PAYNE, S., GRAY, P. & TIZARD, I. (2009) Histopathology and the detection of avian bornavirus in the nervous system of birds diagnosed with proventricular dilatation disease. *Avian Pathology*, 38, 393-401.

OVANESOV, M. V., AYHAN, Y., WOLBERT, C., MOLDOVAN, K., SAUDER, C. & PLETNIKOV, M. V. (2008) Astrocytes play a key role in activation of microglia by persistent Borna disease virus infection. *Journal of Neuroinflammation*, 5, 50.

PAYNE, S., SHIVAPRASAD, H. L., MIRHOSSEINI, N., GRAY, P., HOPPE, S., WEISSENBOCK, H. & TIZARD, I. (2011) Unusual and severe lesions of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) acting as healthy carriers of avian bornavirus (ABV) and subsequently infected with a virulent strain of ABV. *Avian Pathology*, 40, 15-22.

PEREZ, M. & DE LA TORRE, J. C. (2005) Identification of the Borna disease virus (BDV) proteins required for the formation of BDV-like particles. *Journal of General Virology*, 86, 1891-5.

PFANNKUCHE, H., KONRATH, A., BUCHHOLZ, I., RICHT, J. A., SEEGER, J., MULLER, H. & GABEL, G. (2008) Infection of the enteric nervous system by Borna disease virus (BDV) upregulates expression of Calbindin D-28k. *Veterinary Microbiology*, 127, 275-85.

PHALEN, D. N. (1986) An outbreak of psittacine proventricular dilatation syndrome (PPDS) in a private collection of birds and an atypical form of PPDS in a nandya conure. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, Miami, Florida. 27-34

PLANZ, O., PLESCHKA, S. & WOLFF, T. (2009) Borna disease virus: a unique pathogen and its interaction with intracellular signalling pathways. *Cellular Microbiology*, 11, 872-9.

POENISCH, M., BURGER, N., STAEHEL, P., BAUER, G. & SCHNEIDER, U. (2009) Protein X of Borna disease virus inhibits apoptosis and promotes viral persistence in the central nervous systems of newborn-infected rats. *Journal of Virology*, 83, 4297-307.

PRINGLE, C. R., ALEXANDER, D. J., BILLETER, M. A., COLLINS, P. L., KINGSBURY, D. W., LIPKIND, M. A., NAGAI, Y., ORVELL, C., RIMA, B., ROTT, R. & TER MEULEN, V. (1991) The order Mononegavirales. *Archives of Virology*, 117, 137 - 140.

PUORGER, M. E., HILBE, M., MULLER, J. P., KOLODZIEJEK, J., NOWOTNY, N., ZLINSZKY, K. & EHRENSPERGER, F. (2010) Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicolored white-toothed shrews, *Crocidura leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Veterinary Pathology*, 47, 236-44.

PURCHASE, H. G. (1976) Prevention of Marek's disease: a review. *Cancer Res*, 36, 696-700.

PYPER, J. M., CLEMENTS, J. E. & ZINK, M. C. (1998) The nucleolus is the site of Borna disease virus RNA transcription and replication. *Journal of Virology*, 7697 – 7702.

PYPER, J. M. & GARTNER, A. E. (1997) Molecular basis for the differential subcellular localization of the 38- and 39-kilodalton structural proteins of Borna disease virus. *Journal of Virology*, 71, 5133-9.

RAGHAV, R., TAYLOR, M., DELAY, J., OJKIC, D., PEARL, D. L., KISTLER, A. L., DERISI, J. L., GANEM, D. & SMITH, D. A. (2010) Avian bornavirus is present in many tissues of psittacine birds with histopathologic evidence of proventricular dilatation disease. *J Vet Diagn Invest*, 22, 495-508.

RAVINDRANATH, M. H., GONZALES, A. M., NISHIMOTO, K., TAM, W. Y., SOH, D. & MORTON, D. L. (2000) Immunology of gangliosides. *Indian J Exp Biol*, 38, 301-12.

REAVILL, D. & SCHMIDT, R. (2007) Lesions of the proventriculus/ventriculus of pet birds: 1640 cases. *Proc Annu Conf Assoc Avian Vet*, 89- 93

REICHELT, U. (2009) Epizootiologische Untersuchungen zur Bornaschen Krankheit bei Pferden in Bayern und Darstellung des monoklonalen Antikörpers 38/15H7. *Dissertation aus der Klinik für Pferde, Allgemeine Chirurgie und Radiologie*. Berlin, Freie Universität

REUTER, A., ACKERMANN, A., KOTHLOW, S., RINDER, M., KASPERS, B. & STAEHELI, P. (2010) Avian bornaviruses escape recognition by the innate immune system. *Viruses*, 2, 927-938.

RICH, G. A. (1992) Classic and atypical cases of proventricular dilatation disease. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, 119 - 125

RICHT, J. A., HERZOG, S., HABERZETTL, K. & ROTT, R. (1993) Demonstration of Borna disease virus-specific RNA in secretions of naturally infected horses by the polymerase chain reaction. *Medical Microbiology and Immunology*, 182, 293-304.

RICHT, J. A., SCHMEEL, A., FRESE, K., CARBONE, K. M., NARAYAN, O. & ROTT, R. (1994) Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *Journal of Experimental Medicine*, 179, 1467-73.

RICHT, J. A., STITZ, L., WEKERLE, H. & ROTT, R. (1989) Borna disease, a progressive meningoencephalomyelitis as a model for CD4+ T cell-mediated immunopathology in the brain. *Journal of Experimental Medicine*, 170, 1045-50.

RICHTER, K., HAUSMANN, J. & STAEHELI, P. (2009) Interferon-gamma prevents death of bystander neurons during CD8 T cell responses in the brain. *American Journal of Pathology*, 174, 1799-807.

RIDGWAY, R. A. & GALLERSTEIN, G. A. (1983) Proventricular dilatation in psittacines. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, San Diego, Californien. 228- 230

RINDER, M., ACKERMANN, A., KEMPF, H., KASPERS, B., KORBEL, R. & STAEHELI, P. (2009) Broad tissue and cell tropism of avian bornavirus in parrots with proventricular dilatation disease. *J Virol*, 83, 5401-7.

RINDER, M., KASPERS, B. & STAEHELI, P. (2010) Diagnostik von aviären Bornaviren. 16.DVG-Tagung über Vogelkrankheiten, München. 34-37

RITCHIE, B. W., HARRISON, G. J. & HARRISON, L. R. (1994) Avian medicine: principles and application, chapter 31- 36.,

RITTER, H. (2007) Retrospektive feingewebliche Untersuchung von Psittaziden mit der Verdachtsdiagnose Neuropathische Magendilatation. *Dissertation der Tierärztlichen Fakultät*. München, Ludwig- Maximilians- Universität.

ROSARIO, D., PEREZ, M. & DE LA TORRE, J. C. (2005) Functional characterization of the genomic promoter of borna disease virus (BDV): implications of 3'-terminal sequence heterogeneity for BDV persistence. *Journal of Virology*, 79, 6544-50.

ROSENTHAL, K. L. (2008) Diagnosis of proventricular dilatation disease in psittacine birds via fluoroscopy. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, 435

ROSSI, G., CROSTA, L. & PESARO, S. (2008) Parrot proventricular dilatation disease. *Veterinary Record*, 163, 310.

SAUDER, C. & STAEHELI, P. (2003) Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications. *J Virol*, 77, 12886-90.

SCHNEEMANN, A., SCHNEIDER, P. A., LAMB, R. A. & LIPKIN, W. I. (1995) The remarkable coding strategy of borna disease virus: a new member of the nonsegmented negative strand RNA viruses. *Virology*, 210, 1-8.

SCHNEIDER, U., MARTIN, A., SCHWEMMLE, M. & STAEHELI, P. (2007) Genome trimming by Borna disease viruses: viral replication control or escape from cellular surveillance? *Cellular and Molecular Life Sciences*., 64, 1038-42.

SCHNEIDER, U., SCHWEMMLE, M. & STAEHELI, P. (2005) Genome trimming: a unique strategy for replication control employed by Borna disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 3441-6.

SHANKAR, V., KAO, M., HAMIR, A. N., SHENG, H., KOPROWSKI, H. & DIETZSCHOLD, B. (1992) Kinetics of virus spread and changes in levels of several cytokine mRNAs in the brain after intranasal infection of rats with Borna disease virus. *Journal of Virology*, 66, 992-8.

SHIVAPRASAD, H. L. (1993) diseases of the nervous system in pet birds: a review and report of diseases rarely documented. *Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians*, 213-222

SHIVAPRASAD, H. L. (2005) proventricular dilatation disease in a peregrine falcon (*Falco peregrinus*). *Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians*, 107- 108

SHIVAPRASAD, H. L., BARR, B. C., WOOD, L. W., DAFT, B. M., MOORE, J. D., KINDE, H., ANDERSON, M. L. & DROUAL, R. (1995) Spectrum of lesions (pathology) of proventricular dialtion syndrome. *Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians*, 505- 506

STAEHELI, P., RINDER, M. & KASPERS, B. (2010) Avian bornavirus associated with fatal disease in psittacine birds. *J Virol*, 84, 6269-75.

STAEHELI, P., SAUDER, C., HAUSMANN, J., EHRENSPERGER, F. & SCHWEMMLE, M. (2000) Epidemiology of Borna disease virus. *J Gen Virol*, 81, 2123-35.

STEINMETZ, A., PEES, M., SCHMIDT, V., WEBER, M., KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. E. & OECHTERING, G. (2008) Blindness as a sign of proventricular dilatation disease in a grey parrot (*Psittacus erithacus erithacus*). *J Small Anim Pract*, 49, 660-2.

STEVENSON, P. G., HAWKE, S., SLOAN, D. J. & BANGHAM, C. R. (1997) The immunogenicity of intracerebral virus infection depends on anatomical site. *Journal of Virology*, 71, 145-51.

STITZ, L., NOSKE, K., PLANZ, O., FURRER, E., LIPKIN, W. I. & BILZER, T. (1998) A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *Journal of Virology*, 72, 8884-92.

STITZ, L., SCHILKEN, D. & FRESE, K. (1991) Atypical dissemination of the highly neurotropic Borna disease virus during persistent infection in cyclosporine A-treated, immunosuppressed rats. *Journal of Virology*, 65, 457-60.

SUEDMEYER, W. K. (1992) diagnosis and clinical progression of three cases of proventricular dilatation syndrome. *Journal of avian medicine and surgery*, 6, 159- 163.

TANIYAMA, H., OKAMOTO, M., HIRAYAMA, K., HAGIWARA, K., KIRISAWA, R., KAMITANI, W., TSUNODA, N. & IKUTA, K. (2001) Equine Borna disease in Japan. *Veterinary Record*, 148, 480-2.

TOMONAGA, K., KOBAYASHI, T. & IKUTA, K. (2002) Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect*, 4, 491-500.

TURNER, R. (1984) Macaw fading or wasting syndrome. Proceedings Western Poultry Disease Conference, Davis, Californien. 87- 88

VAHLENKAMP, T. W., KONRATH, A., WEBER, M. & MULLER, H. (2002) Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *Journal of Virology*, 76, 9735-43.

VILLANUEVA, I., GRAY, P., MIRHOSSEINI, N., PAYNE, S., HOPPE, S., HONKAVUORI, K. S., BRIESE, T., TURNER, D. & TIZARD, I. (2009) The

diagnosis of proventricular dilatation disease: Use of a Western blot assay to detect antibodies against avian Bornavirus. *Veterinary Microbiology*.

VILLANUEVA, I., GRAY, P., MIRHOSSEINI, N., PAYNE, S., HOPPE, S., HONKAVUORI, K. S., BRIESE, T., TURNER, D. & TIZARD, I. (2010) The diagnosis of proventricular dilatation disease: Use of a Western blot assay to detect antibodies against avian Bornavirus. *Veterinary Microbiology*, 14, 2-4.

WEDEL, A. (2004) Ziervögel - Erkrankung, Haltung, Fütterung. Parey Verlag, pp 141 - 225

WEISSENBOCK, H., BAKONYI, T., SEKULIN, K., EHRENSPERGER, F., DONELEY, R. J., DURRWALD, R., HOOP, R., ERDELYI, K., GAL, J., KOLODZIEJEK, J. & NOWOTNY, N. (2009a) Avian bornaviruses in psittacine birds from Europe and Australia with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis*, 15, 1453-9.

WEISSENBOCK, H., FRAGNER, K., NEDOROST, N., MOSTEGL, M. M., SEKULIN, K., MADERNER, A., BAKONYI, T. & NOWOTNY, N. (2010) Localization of avian bornavirus RNA by in situ hybridization in tissues of psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Vet Microbiol*.

WEISSENBOCK, H., NOWOTNY, N., CAPLAZI, P., KOLODZIEJEK, J. & EHRENSPERGER, F. (1998) Bornavirus disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2127-30.

WEISSENBOCK, H., SEKULIN, K., BAKONYI, T., HOGLER, S. & NOWOTNY, N. (2009b) Novel avian bornavirus in a nonpsittacine species (Canary; *Serinus canaria*) with enteric ganglioneuritis and encephalitis. *J virol*, 83, 11367-71.

WILLISON, H. J. & KENNEDY, P. G. (1993) Gangliosides and bacterial toxins in Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol*, 46, 105-12.

WOERPEL, R. W. & ROSSKOPF, W. J. (1984a) Clinical and pathological features of macaw wasting disease (proventricular dilatation syndrome). Proceedings Western Poultry Disease Conference, Davis, Californien. 89- 90

WOERPEL, R. W. & ROSSKOPF, W. J. (1984b) Proventricular dilatation syndrome: myenteric ganglioneuritis and encephalomyelitis of psittacines; an update. Proceedings Annual Conference, Association of Avian Veterinarians, Toronto. 25- 28

ZHANG, G., KOBAYASHI, T., KAMITANI, W., KOMOTO, S., YAMASHITA, M., BABA, S., YANAI, H., IKUTA, K. & TOMONAGA, K. (2003) Borna disease virus phosphoprotein represses p53-mediated transcriptional activity by interference with HMGB1. *Journal of Virology*, 77, 12243-51.

ZHENG, Y. M., SCHAFER, M. K., WEIHE, E., SHENG, H., CORISDEO, S., FU, Z. F., KOPROWSKI, H. & DIETZSCHOLD, B. (1993) Severity of neurological signs and degree of inflammatory lesions in the brains of rats with Borna disease correlate with the induction of nitric oxide synthase. *Journal of Virology*, 67, 5786-91.

ZWICK, W. (1939) Bornasche Krankheit und Enzephalomyelitis der Tiere. In: Handbuch der Viruskrankheiten. Eds GILDEMEISTER, E., HAAGEN, E. & WALDMANN, O., Bd. 2, pp 254 - 356

ZWICK, W. & SEIFRIED, O. (1925) Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn- und Rückenmarksentzündung des Pferdes (Bornasche Krankheit) auf kleine Versuchtiere (Kaninchen). *Berliner tierärztliche Wochenschrift*, 129 - 132.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Gehirn (links, 25x) und Nebenniere (rechts, 25x) von Vogel #11361.

Abbildung 2. Drüsenmagen des Vogels #7560.

Abbildung 3. Gehirn (links, 40x) und Kleinhirn (rechts, 10x) von Vogel #7856.

Abbildung 4. Retina (links, 25x) und Ziliarkörper (rechts, 10x) von Vogel #113.

Abbildung 5. Kropf (a, 40x), Muskelmagen (b, 10x) und Enddarm (d, 40x) von Vogel #7560.

Abbildung 6. Pankreas (25x) von Vogel #7856.

Abbildung 7. Schilddrüse (links, 25x) von Vogel #7611 und Vogel #7560 (rechts, 25x).

Abbildung 8. a) Hoden (25x) von Vogel #11851. b) Ovar (10x) und c) Ovidukt (10x) von Vogel #113. Ovar (10x) von Vogel #11361.

Abbildung 9. Herz (100x) von Vogel #7560.

Abbildung 10. Niere (links, 25x) von Vogel #7611 und #7560 (rechts, 25x).

Abbildung 11. Muskulatur von Vogel #7611 (links, 10x) und #7560 (rechts, 100x).

Abbildung 12. Federanschnitt von Vogel #113 (10x).

X. DANKSAGUNG

Zum Schluss möchte ich allen herzlich danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Prof. Rüdiger Korbel für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, die großzügige Unterstützung und hilfreichen Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Monika Rinder für die herausragende Betreuung, Motivation und konstruktive Kritik ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Außerdem möchte ich den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische für vielfältige Unterstützung danken. Insbesondere Frau Renate Englert und Kerstin Blüthgen haben mir in der Histologie und Virologie tatkräftig beigestanden.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank den wissenschaftlichen Mitarbeitern des virologischen Instituts in Freiburg für die Vermittlung technischer Grundlagen. Besonders um mich bemüht haben sich Rosita Frank und Antje Reuter.

Diese Arbeit wäre nicht fertig geworden, wenn mir nicht in der Not jemand ein Zimmer zur Verfügung gestellt hätte. Vielen Dank, Alex!

Zuletzt möchte ich meiner Familie und Freunden danken für ihre Geduld und Verständnis, ihren Glauben an mich und ein offenes Ohr.